



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

**Caracterización funcional del gen *VOZ1*, su
papel en el control de la arquitectura de la
inflorescencia a través de la regulación de
TFL1.**

**Memoria presentada por
JOSÉ ALFREDO ZAMBRANO RODRÍGUEZ
para optar al grado de DOCTOR por la Universitat
Politécnica de València.**

Director: Francisco Madueño Albi

Valencia, marzo 2013



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Don. **Francisco Madueño Albi**, doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones científicas (CSIC).

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada “Caracterización funcional del gen *VOZ1*, su papel en el control de la arquitectura de la inflorescencia a través de la regulación de *TFL1*”, ha sido realizada por José Alfredo Zambrano Rodríguez bajo mi dirección y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología.

Fdo: Dr. Francisco Madueño Albi

Valencia, marzo de 2013.

RESÚMENES

La arquitectura de la parte aérea de la planta depende de la actividad del meristemo apical del tallo (SAM), que genera todos los órganos aéreos de la planta. Inicialmente, el SAM es un meristemo vegetativo que produce hojas y ramas. Cuando las condiciones son las adecuadas, ocurre la transición floral y el SAM se convierte en un meristemo inflorescente, que produce flores. *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* es un regulador clave de la arquitectura de *Arabidopsis thaliana*, controlando la identidad del SAM. *TFL1* regula la transición floral y mantiene la identidad del meristemo inflorescente, evitando que éste se convierta en una flor. *TFL1* presenta un patrón de expresión único, en el centro del SAM y en la vasculatura del tallo de la inflorescencia, que es fundamental para su función en el control de la arquitectura de la planta. En ausencia de *TFL1* los genes florales se expresan en el SAM, la floración se adelanta y las inflorescencias se convierten en flores. Por el contrario, si *TFL1* se sobreexpresa la floración se retrasa muchísimo. A pesar de su importancia, se sabe muy poco sobre cómo se regula la expresión de *TFL1*. En un trabajo previo dirigido a la búsqueda de reguladores de la expresión de *TFL1*, se identificó a VOZ1 (VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER 1), un factor de transcripción de función desconocida, como una proteína capaz de unirse, en el sistema de híbrido simple en levaduras, a una región del promotor de *TFL1* esencial para su correcta expresión.

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido elucidar la función de VOZ1, en concreto, entender su relación con *TFL1*, si controla su expresión y si participa de alguna manera en el control de la floración.

Para ello, hemos estudiado la expresión de VOZ1 y la localización subcelular de su proteína. La expresión de VOZ1, que solapa con la de *TFL1* en la vasculatura del tallo de la inflorescencia y en el meristemo apical, y la localización de su proteína, que se encuentra en el núcleo y en el citoplasma, es compatible con que VOZ1 actúe regulando la transcripción de *TFL1*.

Por otra parte, mediante diversas aproximaciones, que incluyen ensayos de híbrido simple en levadura, ensayos de activación de la transcripción de la Luciferasa y ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, hemos demostrado que VOZ1 se une *in vivo* al promotor de *TFL1* y hemos localizado la región donde se une. La caracterización de mutantes de inserción en los genes VOZ y de líneas transgénicas que sobreexpresan VOZ1 nos ha permitido concluir que VOZ1 funciona como promotor de la floración y que esa función la ejerce de manera redundante con su homólogo VOZ2. Hemos visto que VOZ1 regula la expresión de *TFL1*, pero los resultados del análisis genético indican que su acción sobre la floración no tiene lugar sólo a través de *TFL1* sino también a través de otras rutas reguladoras de la floración. De acuerdo con eso, hemos visto que cambios en los genes VOZ también afectan a la expresión de otros reguladores clave de la floración.

Por último, hemos observado que VOZ1 no sólo actúa regulando la transcripción de *TFL1* sino que VOZ1 también interacciona físicamente con la proteína TFL1 y con otros factores reguladores clave de la floración.

En resumen, este trabajo ha revelado que VOZ1 es un nuevo regulador de la floración y los datos derivados de su caracterización sugieren la atractiva hipótesis de que conecta diferentes rutas reguladoras de la floración, interaccionando con sus componentes a distintos niveles.

The architecture of the aerial part of the plant depends on the activity of the shoot apical meristem (SAM), which generates all plant aerial organs. Initially, the SAM is a vegetative meristem that produces leaves and shoots. When conditions are right, the floral transition occurs and the SAM becomes an inflorescence meristem, producing flowers. *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* is a key regulator of plant architecture in *Arabidopsis thaliana* by controlling the identity of the SAM. *TFL1* regulates the floral transition and maintains the identity of the inflorescence meristem, preventing it from becoming a flower. *TFL1* shows a unique expression pattern, in the centre of the SAM and in the vasculature of the inflorescence stem, which is essential for its role in the control of plant architecture. In the absence of *TFL1*, floral genes are expressed in the SAM, flowering occurs early, and inflorescences become flowers. On the contrary, if *TFL1* is overexpressed, flowering is greatly delayed. Despite its importance, little is known about how the expression of *TFL1* is regulated. In a previous work aimed to search for regulators of *TFL1* expression, *VOZ1* (VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER), a transcription factor of unknown function, was identified by a yeast one-hybrid screening as a protein capable of binding to a promoter region of *TFL1* essential for its correct expression.

The objective of this Thesis was to elucidate the role of *VOZ1*, specifically, to understand its relationship with *TFL1*, if it controls its expression and if it is somehow involved in the control of flowering.

With this aim, we studied the expression of *VOZ1* and its protein subcellular localization. *VOZ1* expression, which overlaps *TFL1* expression in the vasculature of the inflorescence stem and in the shoot apical meristem, and its protein localization, found in the nucleus and cytoplasm, support that *VOZ1* acts regulating the transcription of *TFL1*.

On the other hand, through various approaches, including yeast one-hybrid, activation of Luciferase transcription and chromatin immunoprecipitation assays, we have demonstrated that *VOZ1* binds *in vivo* to the *TFL1* promoter and we have located the region where the binding occurs. The characterization of insertion mutants in *VOZ* genes and transgenic lines overexpressing *VOZ1* allowed us to conclude that *VOZ1* works as a promoter of flowering and that it performs that function redundantly with its homologue *VOZ2*. We have seen that *VOZ1* regulates the expression of *TFL1* but the results of the genetic analysis indicate that its action on flowering occurs not only through *TFL1* but also through other flowering regulatory pathways. In accordance with this, we have seen that changes in *VOZ* genes also affect the expression of other key regulators of flowering.

Finally, we have observed that *VOZ1* not only acts regulating *TFL1* transcription but *VOZ1* also interacts physically with the *TFL1* protein and other factors that are key regulators of flowering.

In summary, this study has revealed that *VOZ1* is a new regulator of flowering and the data derived from its characterization suggest an attractive hypothesis, that it connects different regulatory pathways of flowering, interacting with their components at different levels.

L'arquitectura de la part aèria de la planta depèn de l'activitat del meristem apical de la tija (SAM), que genera tots els òrgans de la planta. Inicialment, el SAM és un meristem vegetatiu que produeix fulles i branques. Quan les condicions són les adequades, ocorre la transició floral i el SAM es converteix en un meristem inflorescent, que produeix flors. *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* és un regulador clau de l'arquitectura de *Arabidopsis thaliana*, controlant la identitat del SAM. *TFL1* regula la transició floral i manté la identitat del meristem inflorescent, evitant que aquest es convertís en una flor. *TFL1* presenta un patró d'expressió únic, en el centre del SAM i en la vasculatura de la tija de la inflorescència, que és fonamental per a la seua funció en el control de l'arquitectura de la planta. En absència de *TFL1* els gens florals s'expressen en el SAM, la floració s'avança i les inflorescències es converteixen en flors. Per contra, si *TFL1* es sobreexpressa la floració es retarda moltíssim. Malgrat la seua importància, es coneix molt poc sobre com es regula l'expressió de *TFL1*. En un treball previ dirigit a la cerca de reguladors de l'expressió de *TFL1*, es va identificar a *VOZ1* (VASCULAR ONE ZINC-FINGER 1), un factor de transcripció de funció desconeguda, com a una proteïna capaç d'unir-se, en el sistema d'híbrid simple en llevats, a una regió del promotor de *TFL1* essencial per a la seua correcta expressió.

L'objectiu d'aquesta Tesi Doctoral ha sigut elucidar la funció de *VOZ1*, en concret, entendre la seua relació amb *TFL1*, si controla la seua expressió i si participa d'alguna manera en el control de la floració.

Per a açò, hem estudiat l'expressió de *VOZ1* i la localització subcel·lular de la seua proteïna. L'expressió de *VOZ1*, que solapa amb la de *TFL1* en la vasculatura de la tija de la inflorescència i en el meristem apical, i la localització de la seua proteïna, que es troba en el nucli i en el citoplasma, és compatible amb que *VOZ1* actue regulant la transcripció de *TFL1*.

D'altra banda, mitjançant diverses aproximacions, que inclouen assajos d'híbrid simple en llevat, assajos d'activació de la transcripció de Luciferasa i assajos d'immunoprecipitació de cromatina, hem demostrat que *VOZ1* s'uneix in vivo al promotor de *TFL1* i hem localitzat la regió on s'uneix. La caracterització de mutants d'inserció en els gens *VOZ* i de línies transgèniques que sobreexpressen *VOZ1* ens ha permès concloure que *VOZ1* funciona com a promotor de la floració i que esta funció l'exerceix de manera redundant amb el seu homòleg *VOZ2*. Hem vist que *VOZ1* regula l'expressió de *TFL1*, però els resultats de l'anàlisi genètica indiquen que la seua acció sobre la floració no té lloc només a través de *TFL1* sinó també a través d'altres rutes reguladores de la floració. D'acord amb açò, hem vist que canvis en els gens *VOZ* també afecten a l'expressió d'altres reguladors clau de la floració.

Finalment, hem observat que *VOZ1* no solament actua regulant la transcripció de *TFL1* sinó que *VOZ1* també interacciona físicament amb la proteïna *TFL1* i amb altres factors reguladors clau de la floració.

En resum, aquest treball ha revelat que *VOZ1* és un nou regulador de la floració i les dades derivades de la seua caracterització suggereixen l'atractiva hipòtesi que connecta diferents rutes reguladores de la floració, interaccionant amb els seus components a diferents nivells.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	9
1-INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. La arquitectura de la planta.....	15
1.1.1. El desarrollo de la inflorescencia en Arabidopsis.....	16
1.2. Control del desarrollo de la inflorescencia de Arabidopsis.....	18
1.2.1. Control del tiempo de floración.....	18
1.2.1.1. Control del tiempo de floración mediado por la ruta del fotoperiodo....	19
1.2.1.2. Control del tiempo de floración mediado por las rutas autónoma y de la vernalización.....	21
1.2.1.3. Control del tiempo de floración mediado por las giberelinas.....	23
1.2.1.4. Integradores de las distintas rutas reguladoras del tiempo de floración..	23
1.2.2. El desarrollo reproductivo. Los genes de identidad de meristemo floral....	25
1.3. <i>TFL1</i> y el desarrollo de la inflorescencia de Arabidopsis.....	27
1.3.1. La proteína TFL1.....	30
1.3.2. Patrón de expresión de <i>TFL1</i>	32
1.4. Regulación de la expresión <i>TFL1</i>	33
1.4.1. Regulación de <i>TFL1</i> por las rutas inductoras de la floración.....	33
1.4.2. Regulación de <i>TFL1</i> por los genes de identidad del meristemo floral.....	34
1.4.3. El promotor de <i>TFL1</i>	35
1.4.4. Reguladores directos de la expresión de <i>TFL1</i>	36
1.5. Las proteínas VOZ.....	36
1.6. Objetivos de este trabajo.....	38

2-RESULTADOS.....	39
2.1. Identificación de VOZ1 como posible regulador de <i>TFL1</i>	41
2.2. Patrón de expresión del gen <i>VOZ1</i>	42
2.2.1. Distribución del mRNA de <i>VOZ1</i> en distintos tejidos de la planta.....	42
2.2.2. Análisis de la expresión de <i>VOZ1</i> por hibridación <i>in situ</i>	43
2.2.3. Análisis del patrón de expresión de <i>VOZ1</i> mediante una línea transgénica reportera pVOZ1:GUS.....	44
2.3. Análisis de la localización subcelular de la proteína VOZ1.....	47
2.4. Interacción de VOZ1 con el promotor de <i>TFL1</i>	49
2.4.1. Interacción de VOZ1 con el promotor de <i>TFL1</i> en el ensayo de activación de la luciferasa.....	49
2.4.2. Mapeo del sitio de unión de VOZ1 al promotor de <i>TFL1</i>	51
2.4.3. Unión de VOZ1 al promotor de <i>TFL1</i>	54
2.5. Análisis fenotípico de los mutantes de los genes <i>VOZ</i>	56
2.5.1. Aislamiento de mutantes de inserción para los genes <i>VOZ</i>	56
2.5.2. Fenotipo de floración de los mutantes <i>voz</i>	57
2.5.3. Efecto del fotoperiodo sobre la floración de los mutantes <i>voz</i>	59
2.5.4. Efecto de la vernalización sobre la floración de los mutantes <i>voz</i>	61
2.5.5. Efecto de las giberelinas sobre la floración de los mutantes <i>voz</i>	63
2.6. Sobreexpresión de <i>VOZ1</i>	66
2.6.1. Generación de líneas transgénicas con sobreexpresión de <i>VOZ1</i>	66
2.6.2. Fenotipo de floración de las líneas 35S::VOZ1.....	67
2.7. Efecto de VOZ1 en la expresión de <i>TFL1</i>	71
2.7.1. Expresión de TFL1pro::GUS en plantas que sobreexpresan <i>VOZ1</i>	71
2.7.2. Expresión de <i>TFL1</i> en fondos de pérdida o ganancia de función de <i>VOZ1</i>	73

2.8. Caracterización preliminar de <i>VOZ2</i>	74
2.8.1. Expresión del gen <i>VOZ2</i> en distintos tejidos de la planta.....	74
2.8.2. Análisis de la localización subcelular de la proteína <i>VOZ2</i>	75
2.8.3. Interacción de <i>VOZ2</i> con el promotor de <i>TFL1</i> en el ensayo de activación de la luciferasa.....	76
2.9. Interacción genética entre los genes <i>VOZ</i> y <i>TFL1</i>	78
2.9.1. Combinación de pérdida de función de los genes <i>VOZ</i> y <i>TFL1</i>	78
2.9.2. Combinación de ganancia de función de los genes <i>VOZ</i> y <i>TFL1</i>	79
2.10. Efecto de los factores <i>VOZ</i> sobre la expresión de genes reguladores de la floración.....	81
2.11. Interacción de la proteína <i>VOZ1</i> con factores reguladores de la floración.....	82
3-DISCUSIÓN.....	89
3.1. <i>VOZ1</i> codifica un factor de transcripción de expresión en vasculatura.....	91
3.2. <i>VOZ1</i> es un regulador directo de la expresión de <i>TFL1</i>	92
3.3. Los genes <i>VOZ</i> controlan redundantemente el tiempo de floración.....	95
3.4. ¿Cómo actúan los factores <i>VOZ</i> en la regulación de la floración?.....	96
4-CONCLUSIONES.....	101
5-MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
5.1. Material vegetal.....	107
5.2. Microorganismos.....	108
5.2.1. Cepas bacterianas.....	108
5.2.2. Cepas de levadura.....	108
5.3. Plásmidos.....	109

5.4. Oligonucleótidos.....	116
5.5. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de Arabidopsis.....	119
5.5.1. Cultivo de Arabidopsis en invernadero.....	119
5.5.2. Tratamiento de Arabidopsis con giberelinas.....	119
5.5.3. Tratamiento de vernalización.....	120
5.5.4. Cultivo de Arabidopsis <i>in vitro</i>	120
5.5.5. Fertilización cruzada.....	121
5.5.6. Conservación de semillas.....	121
5.5.7. Generación de plantas transgénicas mediante infiltración al vacío.....	121
5.6. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de bacterias.....	122
5.6.1. Medios y condiciones de cultivo.....	122
5.6.2. Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> por electroporación.....	123
5.6.3. Transformación células competentes de <i>A.tumefaciens</i> por electroporación	124
5.7. Medios y condiciones de cultivo y manipulación de levaduras.....	124
5.7.1. Medios y condiciones de cultivo.....	124
5.7.2. Transformación de levaduras (integración de insertos en el genoma).....	125
5.7.3. Transformación simple de levaduras.....	125
5.8. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	126
5.8.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	126
5.8.2. Extracción de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i>	126
5.8.3. Extracción rápida de DNA genómico de Arabidopsis.....	127
5.8.4. Extracción de DNA genómico de alta calidad de Arabidopsis.....	127
5.8.5. Extracción de RNA total de Arabidopsis.....	128
5.9. Métodos de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	129

5.9.1. PCR sobre DNA.....	129
5.9.2. Transcripción reversa (RT).....	130
5.9.3. RT-PCR semicuantitativa.....	130
5.9.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	131
5.10. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	131
5.11. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	132
5.12. Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	132
5.13. Tratamiento de DNA con enzimas modificadores.....	132
5.13.1. Desfosforilación de extremos cohesivos.....	132
5.13.2. Clonaje de fragmentos de DNA amplificados por PCR.....	132
5.13.3. Clonaje de fragmentos de DNA y plásmidos digeridos.....	133
5.13.4. Clonaje de fragmentos de DNA mediante la tecnología <i>Gateway</i>	133
5.14. Hibridaciones <i>in situ</i> de RNA (RNA ISH).....	134
5.14.1. Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina.....	134
5.14.2. Cuantificación de las sondas de RNA.....	134
5.14.3. Prehibridación, hibridación e inmunodetección colorimétrica de la señal.	136
5.15. Métodos de histología y microscopía.....	136
5.15.1. Análisis de la actividad GUS.....	136
5.15.2. Aclarado con hidrato de cloral para la observación del tejido vegetal.....	137
5.15.3. Fijación e inclusión de muestras para ISH.....	137
5.15.4. Obtención de cortes histológicos.....	138
5.15.5. Fotografía a bajo aumento.....	139
5.15.6. Microscopía óptica.....	139
5.15.7. Microscopía confocal.....	139

5.16. Ensayos que implicaron el uso de expresión transitoria en hojas de <i>Nicotiana</i>	140
5.16.1. Ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC).....	140
5.16.2. Ensayos de activación de la Luciferasa.....	141
5.16.3. Localización subcelular de las proteínas VOZ en <i>Nicotiana benthamiana</i>	142
5.17. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	143
5.17.1. Entrecruzamiento.....	143
5.17.2. Preparación de las “beads”.....	143
5.17.3. Extracción y sonicación del DNA.....	144
5.17.4. Inmunoprecipitación.....	144
5.17.5. Lavados.....	145
5.17.6. Elución.....	145
5.17.7. Reversión del entrecruzamiento.....	146
5.18. Ensayos de híbrido simple en levadura.....	146
 6-BIBLIOGRAFÍA.....	 149
 AGRADECIMIENTOS.....	 169

ABREVIATURAS

3'NCS: Secuencia no codificante localizada en 3' de un gen

5'NCS: Secuencia no codificante localizada en 5' de un gen

A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*

BAR: Bio-Array Resource

°C: grados centígrados

cDNA: DNA codificante

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina

Col: Ecotipo Columbia silvestre

kb: kilo bases.

kg: kilogramos.

GAs: Giberelinas

GFP: Proteína verde fluorescente

Ler: Ecotipo *Landsberg erecta*

LB: medio Luria-Bertani

mg: miligramos.

min: minutos.

ml: mililitros.

mm: milímetros.

mM: milimolar

miRNA: micro RNA

mRNA: RNA mensajero

NCS: Secuencia no codificante

ORF: Pauta abierta de lectura

qRT-PCR: Retrotranscripción acoplada a PCR cuantitativa

RNA ISH: Hibridación *in situ* de RNA

SAM: Meristemo floral del tallo

TAIR: The Arabidopsis Information Resource

TFLpro: 5'NCS+3'NCS de *TFLI*

TFLpro::GUS: Construcción que contiene el gen delator GUS fusionado a las secuencias no codificantes

5' y 3' del gen TFL1.

v/v: volumen por volumen.

W: vatios.

WT: silvestre.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico.

UTR: Región no traducible.

1-INTRODUCCIÓN

1.1. La arquitectura de la planta.

Las plantas presentan una inmensa diversidad en la forma de su parte aérea. La arquitectura de la parte aérea depende de la variación en forma, tamaño, número y disposición de los órganos aéreos: las hojas, los tallos y las flores (de las que derivan los frutos) (Benlloch *et al.*, 2007).

En las plantas, el desarrollo es fundamentalmente postembrionario. Durante la embriogénesis, se generan el meristemo apical del tallo y el meristemo apical de la raíz, los cotiledones, la radícula y el hipocotilo, estableciéndose el patrón apical-basal de desarrollo de la planta (Fig. 1.1). Al mismo tiempo, también se establece el patrón radial de desarrollo con la formación de la epidermis, el tejido conectivo y la vasculatura (Fig. 1.1) (Bowman, 1994; Meyerowitz y Somerville, 1994).

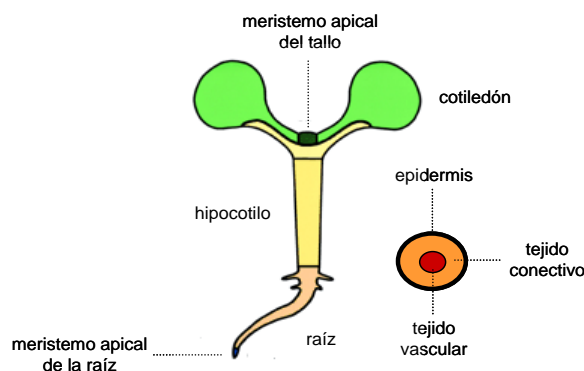


Figura 1.1. Estructura de la plántula de Arabidopsis. A la izquierda, se muestran los componentes básicos del eje apical-basal de desarrollo: el meristemo apical del tallo, los cotiledones, el hipocotilo y la raíz, con el meristemo apical de la raíz en el extremo. A la derecha, se muestra la estructura del eje radial compuesta de 3 tejidos: la epidermis, tejido conectivo y tejido vascular. Imagen modificada a partir de Serrano-Mislata (2010).

Todos los órganos de la parte aérea de la planta se desarrollan a partir de un grupo de células madre pluripotentes que se encuentran en el meristemo apical del tallo. Durante el ciclo de vida de la planta, el meristemo apical del tallo (SAM) atraviesa dos fases de desarrollo, la fase vegetativa y la reproductiva. Durante la fase vegetativa, el SAM es un meristemo que produce órganos vegetativos, típicamente hojas con meristemos axilares en sus flancos. Posteriormente, al percibir las correspondientes señales ambientales y endógenas, ocurre la transición a la fase reproductiva, y el SAM adquiere una identidad inflorescente (Irish, 2010). El SAM inflorescente dará lugar a la inflorescencia, la parte de la planta donde se localizan las flores (Weberlig, 1992). Las inflorescencias presentan una gran variedad de arquitecturas distintas, lo que contribuye en gran parte a la enorme diversidad morfológica que se observa entre las angiospermas.

1.1.1. El desarrollo de la inflorescencia en *Arabidopsis*.

En *Arabidopsis*, tras la germinación, el SAM pasa por una fase vegetativa en la que producen hojas con apenas elongación de los entrenudos entre ellas, por lo que se forma una roseta. Estas, a su vez, contienen en sus axilas nuevos meristemos, denominados meristemos axilares. La duración de la fase vegetativa depende principalmente de las condiciones ambientales, temperatura y fotoperiodo; y del fondo genético (Bowman, 1994).

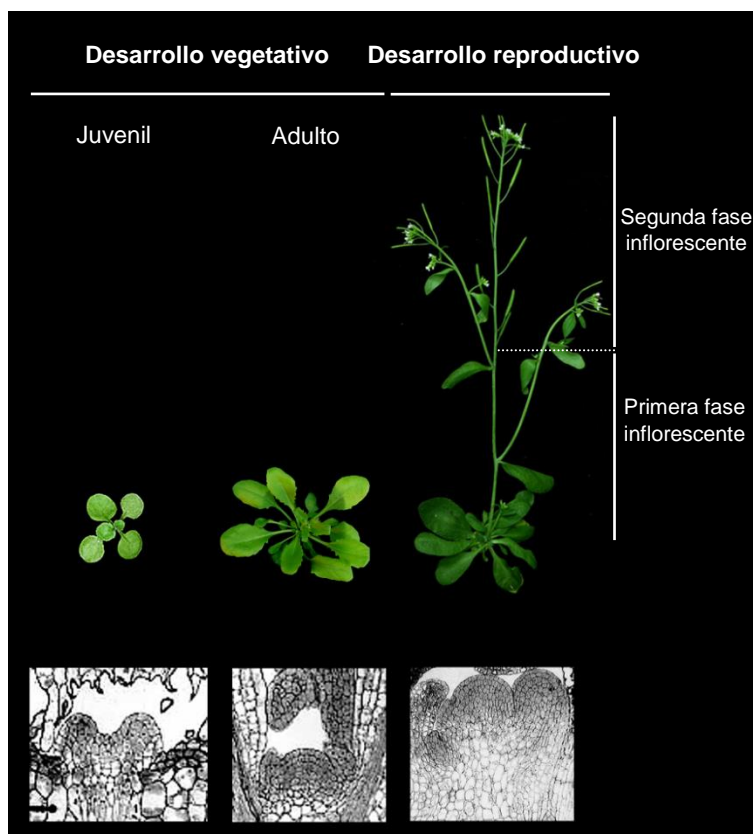


Figura 1.2. Desarrollo post-embriionario de *Arabidopsis*. De izquierda a derecha en la figura, en la parte superior, principales fases del desarrollo en *Arabidopsis*: vegetativa juvenil, vegetativa adulta y reproductiva, o inflorescente, la inflorescente se divide en dos fases. Las fases del desarrollo en *Arabidopsis* están asociadas a cambios en la morfología del meristemo apical del tallo tal como se muestra en la parte inferior de la imagen. Imagen modificada a partir de Serrano- Mislata (2010).

El desarrollo vegetativo en *Arabidopsis* presenta a su vez dos fases, juvenil y adulta. Estas fases se diferencian por la forma del meristemo, que en la fase vegetativa juvenil es aplanado y en la fase vegetativa adulta es ligeramente convexo; otra diferencia es la disposición y morfología de las hojas (Fig. 1.2). La floración en *Arabidopsis* sólo ocurre en la fase vegetativa adulta, independientemente de que en la fase vegetativa juvenil se den las condiciones ambientales adecuadas. Esta transición a la fase reproductiva, denominada la transición floral, está regulada por un conjunto de factores exógenos

(fotoperiodo, intensidad lumínica, temperatura ambiente...) y endógenos (edad de la planta, giberelinas...).

Tras la transición floral, la planta inicia el desarrollo reproductivo y el SAM pasa a ser un meristemo inflorescente, que adopta una morfología redondeada, debido al incremento en la actividad mitótica de las células. (Bowman, 1994; Meyerowitz y Someville, 1994). El desarrollo reproductivo puede subdividirse, de nuevo, en dos fases (Fig. 1.2). En la primera fase inflorescente el SAM genera hojas caulinares con nuevos meristemos axilares asociados, y en la segunda fase genera meristemos florales que dan lugar a las flores. La transición entre estas dos fases ocurre de forma abrupta. El desarrollo de las hojas caulinares y de los primeros primordios de flores va seguida del aumento en la longitud de los entrenudos, y se produce la elongación del tallo de la inflorescencia, proceso al que se denomina “*bolting*”. (Bowman, 1994; Meyerowitz y Someville, 1994).

En *Arabidopsis* el meristemo apical del tallo presenta un crecimiento indeterminado, generando órganos en sus flancos durante todo el ciclo de vida de la planta. Los órganos generados se disponen en el tallo de la inflorescencia siguiendo una filotaxis espiral. En las plantas de los ecotipos Col o Ler cultivadas en día largo la inflorescencia principal produce de una a tres hojas caulinares y, posteriormente produce de 30 a 40 flores tras las cuales la planta detiene su crecimiento (Fig. 1.3). Las flores de *Arabidopsis* tienen la morfología típica de las Crucíferas y no están sustentadas por brácteas. (Smyth *et al.*, 1990). Por otra, parte a partir de los meristemos axilares de las hojas caulinares se forman las ramas secundarias, también conocidas como coflorescencias (Weberling, 1989); estas inflorescencias secundarias repiten el patrón de desarrollo de la inflorescencia principal (Fig. 1.3) (Koornneef *et al.*, 1991; Schultz y Haughn, 1991; Shannon y Meeks-Wagner, 1991; Alvarez *et al.*, 1992). Una vez formada la inflorescencia principal, la planta puede desarrollar nuevas inflorescencias, a partir de las axilas de las hojas de roseta (Fig.1.3), que se conocen como inflorescencias de roseta (Alvarez *et al.*, 1992).

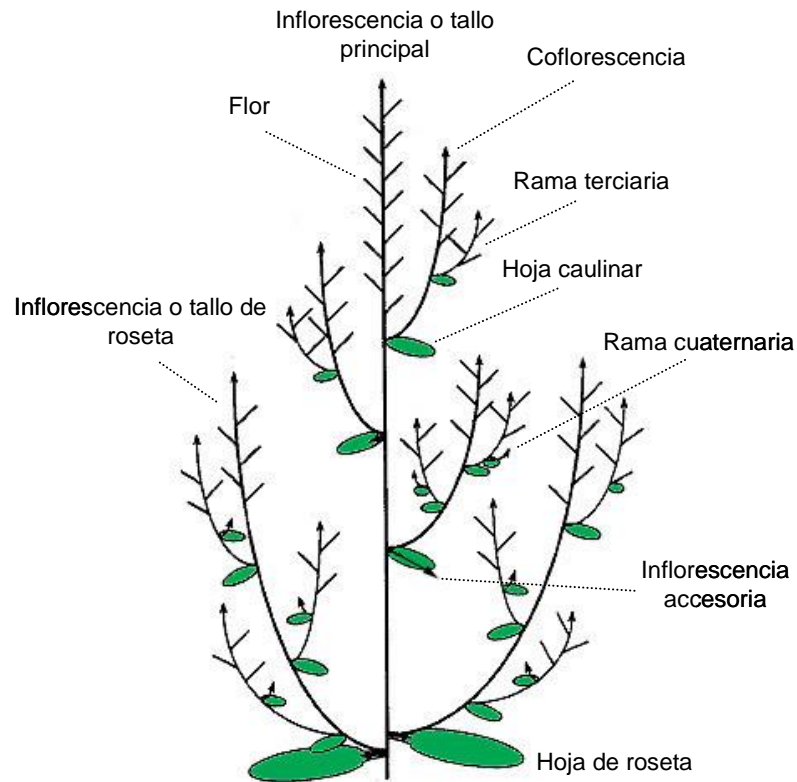


Figura 1.3. Estructura de la inflorescencia de *Arabidopsis*, ecotipo *Ler*, a los 30 días de crecimiento en día largo. El diagrama muestra todas las hojas caulinares, sin embargo sólo se representan las hojas de roseta que contienen inflorescencias asociadas. Las flechas indican ejes de crecimiento indeterminado. Los óvalos verdes representan hojas, tanto caulinares como de roseta. Las líneas diagonales representan flores. Imagen modificada a partir de Alvarez *et al.*, (1992).

1.2. Control del desarrollo de la inflorescencia de *Arabidopsis*.

1.2.1. Control del tiempo de floración.

Debido a su naturaleza sésil, las plantas aseguran su éxito reproductivo floreciendo sólo cuando las condiciones son las idóneas. Las plantas tienen la capacidad de reconocer el paso de las estaciones gracias a diferentes indicadores ambientales como son la longitud del día, o fotoperiodo, y la temperatura. En *Arabidopsis* la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva del desarrollo está regulada por una compleja red de rutas genéticas que integran información procedente del ambiente (fotoperiodo, intensidad lumínica, temperatura, vernalización, disponibilidad de nutrientes...) y de factores endógenos de la planta (edad, giberelinas...).

Se han descrito varias rutas genéticas de las que depende la floración en *Arabidopsis* (Amasino *et al.*, 2010). Las *rutas* dependientes del *fotoperiodo*, y de la *vernalización* (exposición a un periodo prolongado de frío) integran información procedente del ambiente. Paralelamente, la *ruta autónoma* recibe información del momento de desarrollo en el que se encuentra la planta y de la temperatura ambiental, y la *ruta de las giberelinas* es necesaria para la floración en condiciones de día corto. Toda la información que procede de las rutas anteriormente mencionadas converge en la regulación transcripcional de varios *integradores florales*. Estos integradores florales regulan a la vez la actividad de los *genes de identidad del meristemo floral*, los cuales inducirán la formación de las flores en los flancos del meristemo inflorescente.

Recientemente se ha descrito una nueva *ruta* reguladora de la floración en *Arabidopsis*, que integra información del fotoperiodo y *de la edad de la planta* e implica a los microRNAs (miRNAs) 156 y 172, como también a las familias de factores transcripcionales SQUAMOSA PROMOTER BINDING- LIKE (SPL) y APETALA 2 (AP2). La actividad de esta ruta modula la expresión de diferentes reguladores de la transición floral (Mathieu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009; Yant *et al.*, 2010).

1.2.1.1. Control del tiempo de floración mediado por la ruta del fotoperiodo.

Arabidopsis es una planta facultativa de día largo, es decir, el aumento de la longitud del día induce la floración (Amasino *et al.*, 2010). Este es uno de los modos por los que *Arabidopsis* percibe que el invierno, con días cortos, finaliza y se acerca la primavera. Los primeros genes de la ruta inductora de la floración dependiente del fotoperiodo se identificaron a partir de la caracterización de mutantes como *co*, *ft* y *gi*, que florecen tarde en condiciones de día largo pero florecen al mismo tiempo que el silvestre en día corto (Koornneef *et al.*, 1991). A partir de esta observación se postuló que los genes ***CONSTANS (CO)***, ***FLOWERING LOCUS T (FT)*** y ***GIGANTEA (GI)*** están implicados en la transmisión de la información procedente del fotoperiodo.

La longitud del día se mide a través de la actividad de los fotorreceptores, fitocromos y criptocromos, que contienen pigmentos que se excitan con la luz. La información es integrada por el reloj circadiano, que regula la expresión del gen *CO*, el cual juega un papel clave en la inducción de la floración por fotoperiodos largos (Suárez-

López *et al.*, 2001; Yanovsky y Kay, 2002). El gen *CO* se expresa principalmente en la vasculatura del tallo y las hojas (Putterill *et al.*, 1995, An *et al.*, 2004) y codifica una proteína nuclear con dedos de zinc cuya estabilidad depende del ciclo de luz y oscuridad. (Valverde *et al.*, 2004).

Asimismo, la proteína CO activa en día largo, pero no en día corto, la expresión del gen *FT* (Fig. 1.4) (Suárez-López *et al.*, 2001; Yanovsky y Kay, 2002; Wigge *et al.*, 2005). El RNA mensajero (mRNA) de *FT* se acumula en el floema, particularmente de los cotiledones y hojas (Takada y Goto, 2003; An *et al.*, 2004; Wigge *et al.*, 2005). La proteína FT se transporta desde el floema al meristemo apical del tallo (Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger y Wigge, 2007; Mathieu *et al.*, 2007), donde ejerce su función interaccionando con la proteína **FD**, un factor de transcripción de tipo bZIP (basic region and leucine zipper motif), que se expresa en el meristemo apical desde antes de la transición floral. (Fig. 1.4). (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). El heterodímero FT-FD induce la transcripción en el ápice de genes como *SUPPRESSOR OF CONTANS 1* (*SOCI*) y *APETALA 1* (*API*), que codifican dos factores de transcripción de la familia MADS cuya actividad acaba desencadenando la transición y el desarrollo floral (Fig. 1.4) (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Searle *et al.*, 2006; Michaels y Amasino, 2010).

La expresión del gen *FT* está finamente regulada. Además de ser activada por la ruta del fotoperiodo, a través de CO, la transcripción de FT es reprimida por diferentes vías y de esta manera la floración se retrasa cuando las condiciones no son las adecuadas. Por ejemplo, los factores transcripcionales de la familia MADS **FLOWERING LOCUS C** (**FLC**) y **SHORT VEGETATIVE PHASE** (**SVP**) actúan como un dímero que reprime la transcripción de *FT* en la hoja (Fig. 1.4) (Searle *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Las proteínas remodeladoras de cromatina **TERMINAL FLOWER 2** (**TFL2**) y **EARLY BOLTING IN SHORT DAYS** (**EBS**) reprimen la expresión de *FT*, especialmente en día corto, por mecanismos epigenéticos (Kotake *et al.*, 2003; Piñeiro *et al.*, 2003; Takada y Goto 2003; Germann *et al.*, 2006). Los factores transcripcionales de la familia RAV (related to AVI3/VP1) codificados por los genes **TEMPRANILLO** (**TEM1** y **TEM2**) también reprimen la expresión de *FT* y, de hecho, el balance entre las actividades de *CO* y *TEM1/TEM2* es clave para que se induzca la floración (Castillejo y Pelaz, 2008). Algunos factores transcripcionales de la familia AP2 que son regulados por el miRNA172, como **SCHLAFMÜTZE** (**SMZ**), también reprimen la expresión de *FT* (Aukerman y Sakai, 2003; Mathieu *et al.*, 2009).

1.2.1.2. Control del tiempo de floración mediado por las rutas autónoma y de la vernalización.

La exposición de la planta a un largo periodo de frío, o vernalización, es otro de los factores clave que inducen la floración en *Arabidopsis* (Fig. 1.4). De este modo, la percepción por la planta de un aumento en la longitud del día y su paso por un prolongado periodo (como el invierno), permiten a la planta reconocer el comienzo de la primavera.

Las señales de las rutas autónoma y de vernalización inducen la floración reduciendo el nivel del complejo represor formado por las proteínas FLC y SVP (Fig. 1.4) (Michaels y Amasino, 1999; Hartmann *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2008). Así la expresión de *FLC* y *SVP* en los ápices vegetativo es alta y tras la transición floral prácticamente desaparece (Michaels y Amasino, 1999; Hartmann *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2008). A su vez, FLC y SVP retrasan la floración reprimiendo la transcripción de genes promotores de la misma como *FT*, *FD* y *SOC1*. (Fig. 1.4) (Hepworth *et al.*, 2002; Michaels *et al.*, 2005; Helliwell *et al.*, 2006; Searle *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

El gen **FRIGIDA** (*FRI*), que codifica una proteína que participa indirectamente en la metilación de histonas, juega un papel determinante en conferir un requerimiento de vernalización a accesiones naturales de *Arabidopsis thaliana* (Michaels y Amasino, 1999; Johanson *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2009). *FRI* actúa activando la expresión de *FLC* (Fig. 1.4), y la presencia de mutaciones que afectan a la función o la expresión de *FRI* y *FLC* explican gran parte de la variación natural en el tiempo de floración en los distintos ecotipos de *Arabidopsis* (Johanson *et al.*, 2000; Michaels *et al.*, 2003).

La vernalización también actúa a través de procesos de metilación de histonas que reprimen epigenéticamente la expresión de *FLC*, neutralizando la actividad de *FRI* e induciendo la floración. (Fig. 1.4) (Michaels y Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999; Bastow *et al.*, 2004; Sung y Amasino, 2004). TFL2 es uno de los represores epigenéticos de *FLC* (Mylne *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2006).

La ruta autónoma de inducción de la floración se propuso a partir de mutantes que muestran retraso en la floración independientemente del fotoperiodo y, además, presentan una fuerte respuesta a la vernalización (Koornneef *et al.*, 1991). Participan en esta ruta los genes **FCA**, **FLOWERING LOCUS D (FLD)**, **FLOWERING K (FLK)** **FPA**, **FVE**, **FY** y **LUMINIDEPENS (LD)**. Este grupo de genes presentan una actividad opuesta de la de *FRI*, disminuyendo el nivel de expresión de *FLC* a través de la remodelación de la

cromatina y de la unión a su mRNA (Fig. 1.4) (Bäurle *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Bäurle y Dean, 2008).

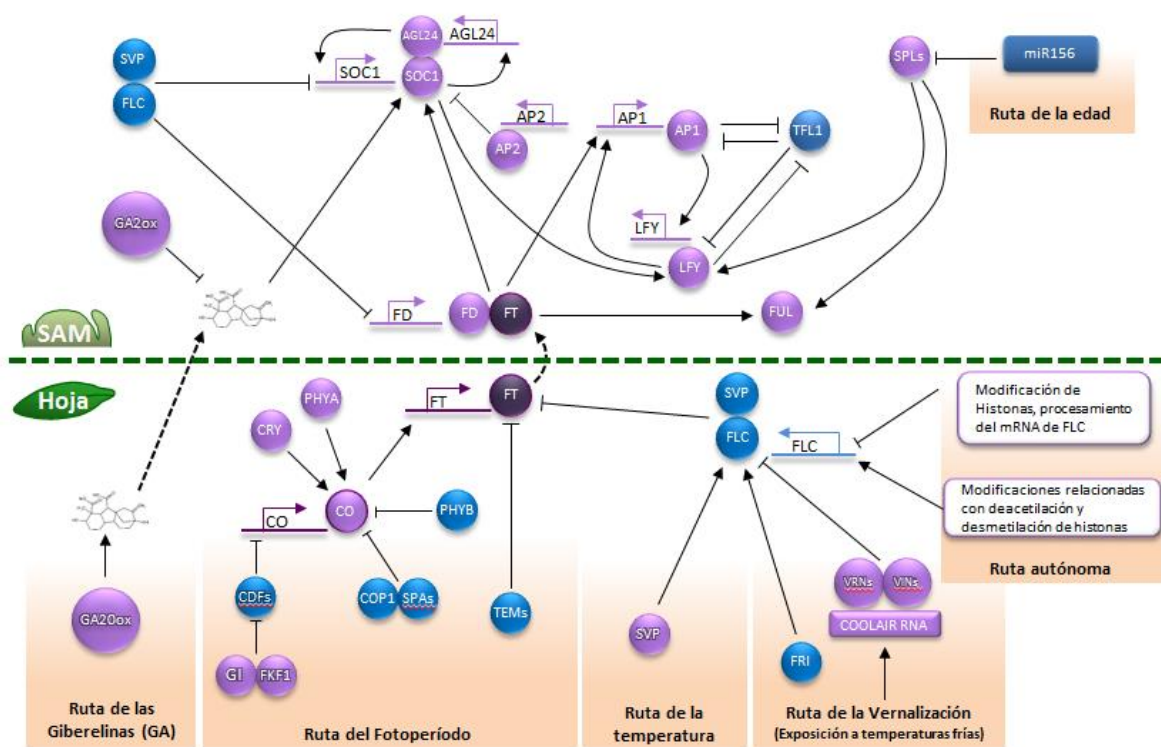


Figura 1.4. Diagrama de las rutas genéticas que regulan el tiempo de floración en *Arabidopsis*. Diferentes rutas responden a varias condiciones externas (fotoperíodo, vernalización, temperatura ambiente) o a señales endógenas (autónoma, edad, giberelinas) para regular la transición floral a través de una elaborada red genética. Las señales inductoras deben primero superar la actividad de varios represores de la transición floral (indicados en azul) y de activadores (indicados en violeta) para eventualmente activar los genes de identidad del meristemo (*AP1* y *LFY*). Las rutas actúan sobre diferentes componentes de la red (genes) en diferentes tejidos; la red genética integra la información entrante a través del cambio de expresión de muchos de sus genes. Flechas, indican interacción positiva. Líneas continuas con barra, indican interacción negativa. Líneas discontinuas, indican movimiento a través de diferentes tejidos. **AGL24:** AGAMOUS-LIKE 24. **AP1:** APETALA 1. **CDF:** CYCLING DOF FACTOR. **CO:** CONSTANS. **COP1:** CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1. **CRY:** CRYPTOCHROME. **FKK1:** FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, FBOX PROTEIN 1. **FRI:** FRIGIDA. **FD:** FLOWERING LOCUS D. **FLC:** FLOWERING LOCUS C. **FT:** FLOWERING LOCUS T. **FUL:** FRUITFULL. **GA20ox:** Gibberelin 20 oxidase. **GA2ox:** Gibberelin 2 oxidase. **GI:** GIGANTEA. **H2AZ:** Histone H2A.Z. **LFY:** LEAFY. **miR156:** microRNA 156. **PHYA:** PHYTOCHROME A. **PHYB:** PHYTOCHROME B. **SOC1:** SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1. **Paf1C:** RNA polimerase associated factor 1 complex. **SPAs:** SUPPRESSOR OF PHYA. **SPLs:** SQUAMOSA PROMOTER BINDING FACTOR-LIKE. **SVP:** SHORT VEGETATIVE PHASE. **TEM:** TEMPRANILLO. **TFL1:** TERMINAL FLOWER 1. **VINs:** VERNALIZATION INSENSITIVE. **VRNs:** VERNALIZATION. Esquema modificado a partir de Fornara *et al.*, 2010; Amasino, 2010.; Wellmer y Riechmann, 2010.

La temperatura ambiental también regula la floración, de modo que las temperaturas bajas, tal como 16°C, la retrasan y las altas, como 23°C, la aceleran. Los genes de la ruta autónoma *FCA* y *FVE* participan en la percepción de la temperatura ambiental (Blázquez *et al.*, 2003). La actividad de *FCA* y *FVE* reprime la expresión del represor *SVP*, que reprime la expresión de *FT* (y, por tanto, la floración) a bajas temperaturas, mientras que a temperaturas altas los niveles del mRNA de *FT* suben (Fig. 1.4) (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

1.2.1.3. Control del tiempo de floración mediado por las giberelinas.

Otra de las rutas que controlan el tiempo de floración es la de la giberelinas, integrando diferentes señales ambientales y endógenas a través de la actividad de las proteínas DELLA. Así, las giberelinas juegan un papel importante en el proceso de transición entre la distintas fases del desarrollo vegetativo y en la transición floral. (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009).

Las giberelinas son esenciales para que ocurra la floración en día corto, cuando la ruta del fotoperiodo no está activa y los niveles del inductor floral *FT* son bajos (Wilson *et al.*, 1992; Wigge *et al.*, 2005). En estas condiciones, las giberelinas activan, por una vía independiente de *FT*, la expresión de genes como *LFY* y *SOC1* (Blázquez *et al.*, 1998; Blázquez y Weigel, 2000; Moon *et al.*, 2003; Hisamatsu y King, 2008), y reprimen la expresión de *SVP* (Li *et al.*, 2008).

Por otra parte, el papel que desempeñan las giberelinas en la floración en condiciones de día largo es menor. Sin embargo, el triple mutante en los genes *GID1*, que codifican los receptores de giberelinas, muestra retraso de la floración en día largo, lo que indica que la giberelinas participan en la inducción floral aunque la ruta del fotoperiodo esté activa (Griffiths *et al.*, 2006; Willige *et al.*, 2007; Srikanth y Schmid, 2011). Recientemente se ha demostrado que las giberelinas inducen la floración en día largo promoviendo la expresión de *FT* en las hojas y de los genes *SPL* en el meristemo (Galvão *et al.*, 2012). También se ha visto que, además, las proteínas DELLA, represores transcripcionales a través de los cuales actúan las giberelinas, interaccionan con las proteínas SPL interfiriendo con su actividad transcripcional (Yu *et al.*, 2012).

Recientemente se ha demostrado que los genes *TEMPRANILLO* (*TEM*) regulan directamente la expresión de los genes de biosíntesis de GAs (*GA3-oxidasa 1* y *2* (*GA3OX1* y *GA3OX2*)). De ese modo, los factores TEM parecen conectar las rutas del fotoperiodo y la de GAs, controlando la transición floral tanto en condiciones de fotoperiodo inductivo como no inductivo mediante la regulación de integradores florales (Osnato *et al.*, 2012).

1.2.1.4. Integradores de las distintas rutas reguladoras del tiempo de floración.

Como se ha descrito hasta este punto, la floración se halla regulada por diferentes rutas genéticas en respuesta a señales ambientales y endógenas. Sin embargo, se ha hecho

evidente que las rutas genéticas que controlan la floración no se hallan estrictamente separadas sino que existe un elevado nivel de comunicación entre las mismas. Así, al final, las distintas rutas señalizadoras regulan la expresión de un número relativamente pequeño de genes, conocidos como "integradores florales".

Uno de los primeros genes que se propuso como integrador floral es *LFY*, que además de tener un papel clave en controlar la identidad del meristemo floral (como se describe en el apartado siguiente) se considera que participa en la regulación de la transición floral, siendo necesario que su nivel de expresión en el ápice del tallo supere un determinado umbral para que la transición ocurra. *LFY* integra información proveniente de las rutas del fotoperiodo (Nilsson *et al.*, 1998), autónoma (Nilsson *et al.*, 1998; Aukerman *et al.*, 1999) y de las giberelinas (Blázquez *et al.*, 1998; Blázquez y Weigel, 2000).

También entre los primeros genes definidos como integrador floral se encuentra el inductor floral *FT*, que, como ya se ha descrito, es activado en día largo por *CO* y por las giberelinas y es reprimido por el heterodímero formado por *SVP* y *FLC*. De esta manera, *FT* integra toda la información proveniente de cuatro rutas que inducen la floración en *Arabidopsis*: fotoperiodo, autónoma, vernalización y giberelinas (Fig. 1.4).

El inductor floral *SOC1* también integra información proveniente de diferentes rutas. Inicialmente, *SOC1* fue identificado como un mediador de las señales que promueven la floración procedentes de las rutas del fotoperiodo, autónoma y de la vernalización (Lee *et al.*, 2000; Onouchi *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000). Así, tanto *CO*, vía *FT*, como *FLC* regulan la expresión de *SOC1* mediante la interacción con diferentes regiones de su promotor (Hepworth *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Además, la expresión de *SOC1* es reprimida por *AP2* y regulada por la ruta de los miRNAs 156 y 172, así como por las familias de factores de transcripción *SPL* y *AP2* (Yant *et al.*, 2010). Por otra parte, *SOC1* percibe información que procede de la ruta de las giberelinas (Moon *et al.*, 2003). En resumen, *SOC1* integra información de varias rutas, siendo un regulador clave de la transición floral (Fig. 1.4).

La expresión de ***AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)***, que codifica un factor de transcripcional de la familia *MADS*, es inducida por la ruta del fotoperiodo, por una vía independiente de *FT*, y por la de la vernalización, por una vía independiente de *FLC*, y como consecuencia, la expresión de *AGL24* aumenta gradualmente en el meristemo apical

durante la transición floral (Michaels *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2002). De este modo, *AGL24* actúa junto con otros genes como conector de las diferentes rutas que inducen la floración.

Tras la transición floral, *AGL24* y *SOC1* forman un complejo activando mutuamente su expresión en el ápice (Liu *et al.*, 2008). Este complejo formado por *AGL24* y *SOC1* induce la expresión de *LFY* en el meristemo floral y, por otra parte, en día corto media el efecto de las giberelinas en la floración (Fig. 1.4). (Lee *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). De esta manera, la actividad de ambos genes en conjunto, promueve la formación de flores en los flancos del meristemo apical, una vez percibidas las señales apropiadas.

Los represores florales *FLC* y *SVP* representan un último punto de conexión entre las rutas que inducen la floración, siendo inhibida su expresión por la actividad de las rutas autónomas y de vernalización (Fig. 1.4). Como se ha descrito en el apartado anterior, las giberelinas también regulan a *SVP*, provocando una reducción de su transcripción en día corto (Li *et al.*, 2008).

1.2.2. El desarrollo reproductivo. Los genes de identidad de meristemo floral.

Como se ha descrito en los apartados anteriores, las rutas inductoras de la floración actúan como sensores del momento en el que las condiciones ambientales y endógenas de la planta son las apropiadas para llevar a cabo la transición floral. Esta información es transmitida a los genes integradores y estos actúan sobre los genes de identidad de meristemo floral, que desencadenan un nuevo programa de desarrollo que conduce a la formación de las flores. Los genes de identidad del meristemo floral se expresan en los flancos del SAM y confieren identidad floral al primordio lateral que se forma. Para ello, activan y controlan la expresión de los genes homeóticos florales, que finalmente son los encargados de dirigir la formación de los órganos de la flor (Irish, 2010). En *Arabidopsis* los principales genes de identidad del meristemo floral son: *LEAFY (LFY)*, *APETALA 1 (AP1)* y *CAULIFLOWER (CAL)* (Fig. 1.4).

LFY codifica un factor de transcripción exclusivo del reino vegetal, presente desde los musgos a las eudicotiledóneas (Maizel *et al.*, 2005). Como se ha descrito en apartados anteriores, *LFY* además de actuar como un gen de identidad del meristemo floral, actúa como un inductor floral en *Arabidopsis*.

Durante el desarrollo de la inflorescencia, *LFY* se expresa a nivel muy alto en los primordios laterales del ápice, especificando la identidad floral de los mismos (Weigel *et*

al.,1992). En el meristemo floral, la primera acción conocida de *LFY* es activar la expresión del gen de identidad floral *API*, el cual a su vez activa la expresión de *LFY* manteniéndola inducida (Bowman *et al.*, 1993; Parcy *et al.*, 1998; Liljegren *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1999; William *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2010). La expresión de *LFY* en el meristemo floral también es activada por heterodímero formado por SOC1-AGL24. La actividad de *LFY* y *API* asegura el mantenimiento de la identidad del meristemo floral, evitando así la reversión a inflorescencia mediante la represión de la expresión en dicho meristemo de un conjunto de genes que incluye a *TFL1* (Fig. 1.4) (Liljegren *et al.*, 1999; Ratcliffe *et al.*, 1999 Kaufmann *et al.*, 2010; Moyroud *et al.*, 2011), *AGL24*, *SVP* y *SOC1* (Yu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). Parte importante de la actividad de *AGL24*, *SVP*, y *SOC1*, durante los primeros estadios del desarrollo floral, es evitar la expresión prematura de genes homeóticos de tipo B y C. (Gregis *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). En estadios posteriores del desarrollo floral *LFY* también regula los genes homeóticos florales, activando su expresión. (Lee *et al.*, 1997; Parcy *et al.*, 1998; Busch *et al.*, 1999; Honma y Goto, 2000; Lenhard *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2002; Parcy *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003; Chae *et al.*, 2008).

Las proteínas *API* y *CAL* son factores transcripcionales de la familia MADS con alto nivel de homología y función redundante (Mandel *et al.*, 1992; Kempin *et al.*, 1995). Como se ha comentado, *LFY* induce la expresión de *API* y *CAL* en los meristemos florales jóvenes (Parcy *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1999; William *et al.*, 2004). Por otra parte, también se ha descrito que el complejo FT-FD participa en la activación de la expresión de *API* en los meristemos florales (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005), aunque recientemente se ha cuestionado que esta activación sea directa (Benlloch *et al.*, 2011). Finalmente, en estadios posteriores, la expresión de *API* y de *CAL* se localiza en los primordios de los órganos de los dos verticilos externos de la flor, donde *API* actúa como un gen homeótico floral controlando, junto a ***APETALA 2 (AP2)***, la identidad de sépalos y pétalos (Irish y Sussex, 1990; Mandel *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1993).

Además de a *LFY*, *API* y *CAL*, también se considera como genes de identidad del meristemo floral a los genes ***FRUITFULL (FUL)*** y *AP2*.

FUL codifica un factor transcripcional de la familia MADS emparentado con *API* y *CAL* (Mandel y Yanofsky, 1995) y su expresión se activa durante la transición floral, en el meristemo inflorescente, por el dímero FT-FD y por factores transcripcionales de la familia SPL (Fig. 1.4) (Mandel y Yanofsky, 1995; Teper-Bamnolker y Samach, 2005; Wigge *et*

al., 2005; Yamaguchi *et al.*, 2009). *FUL* participa en diversos procesos del desarrollo, y su implicación en la identidad de meristemo floral se basa, en gran parte, en la observación de que en el triple mutante *ap1 cal ful*, las flores son sustituidas por inflorescencias, como consecuencia de que la expresión de *LFY* no se induce y de que *TFL1* se expresa ectópicamente en lo que deberían ser los meristemos florales (Ferrándiz *et al.*, 2000a). *FUL* también regula, de forma redundante con *SOC1*, las transiciones de fase del meristemo apical de *Arabidopsis* y el doble mutante *soc1 ful* presenta floración muy tardía (Melzer *et al.*, 2008). *FUL* también participa en el desarrollo del fruto, siendo necesario para la diferenciación y expansión de las valvas tras la fertilización (Gu *et al.*, 1998; Ferrándiz *et al.*, 2000).

Por último, *AP2* codifica un factor transcripcional perteneciente a una familia con un dominio característico de unión a DNA el; “domino AP2” (Jofuku *et al.*, 1994; Okamuro *et al.*, 1997a) que actúa en la especificación de los meristemos florales, reforzando la actividad de *LFY* y *AP1* (Sussex, 1990; Bowman *et al.*, 1993; Irish y Schultz y Haughn, 1993). Por otra parte, *AP2* participa en otros procesos del desarrollo de *Arabidopsis*, tales como la transición floral (Jofuku *et al.*, 1994; Okamuro *et al.*, 1997b; Yant *et al.*, 2010), la especificación de la identidad de pétalos y sépalos (Bowman *et al.*, 1989; Bowman *et al.*, 1991; Drews *et al.*, 1991) y el desarrollo de las semillas (Jofuku *et al.*, 1994; Jofuku *et al.*, 2005; Ohto *et al.*, 2005).

1.3. *TFL1* y el desarrollo de la inflorescencia de *Arabidopsis*.

El gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* es un regulador clave del desarrollo de la inflorescencia de *Arabidopsis*, y las alteraciones en la función de *TFL1* afectan severamente a la arquitectura de la parte aérea de la planta. Las diferencias más notables entre el mutante *tfl1* y la planta silvestre son que las plantas mutantes *tfl1* muestran adelanto en la floración y que sus inflorescencias son determinadas, hallándose transformadas en flores (Fig. 1.5) (Shannon y Meeks-Wagner, 1991; Alvarez *et al.*, 1992; Schultz y Haughn, 1993; Bradley *et al.*, 1997).

El patrón de desarrollo de los mutantes *tfl1* durante la fase vegetativa es aparentemente normal, no observándose alteraciones en el ritmo de producción de hojas de roseta, en su morfología o en la distribución de tricomas. No obstante, las plantas *tfl1* florecen antes, tras haber producido menos hojas de roseta que el silvestre (Fig. 1.5). Este

adelanto en la floración se da tanto en día largo como en día corto (Shannon y Meeks-Wagner, 1991; Bradley *et al.*, 1997).

Además, el desarrollo inflorescente de las plantas *tfl1* se encuentra severamente afectado (Fig. 1.5). En día largo, la primera fase inflorescente se acorta ligeramente, formándose sólo una o dos hojas caulinares. La segunda fase inflorescente es muy corta y, tras la producción de entre una y cinco flores, el ápice se determina formando una flor terminal. Los meristemas axilares asociados a las hojas caulinares no suelen desarrollarse como coflorescencias, sino como flores, denominadas flores axilares, con una morfología esencialmente silvestre (Meeks-Wagner, 1991; Alvarez *et al.*, 1992; Schultz y Haughn, 1993; Shannon y Bradley *et al.*, 1997). En resumen, la mutación *tfl1* reduce la longitud de todas las fases del desarrollo de la planta.



Figura 1.5. Las modificaciones de la actividad de *TFL1* afectan a la arquitectura de la inflorescencia de *Arabidopsis*. En todas las plantas, excepto en (B), se han eliminado las inflorescencias de roseta para facilitar la observación de la arquitectura de la inflorescencia principal. **A).** Planta silvestre del ecotipo Col cultivada en día largo. **B)** Planta *tfl1-1* cultivada en día largo. Esta imagen se ha ampliado respecto al resto para resaltar las modificaciones en la arquitectura de la inflorescencia. La flecha indica una “inflorescencia de roseta” que se reduce a una única flor sustentada por un pedicelo muy largo. **C)** Planta 35Spro::TFL1, ecotipo Col, cultivada en día largo. Esta planta aún no ha entrado en la segunda fase inflorescente, donde se forman las flores. **D)** Planta silvestre del ecotipo Col cultivada en día corto. **E)** Planta *tfl1-1* cultivada en día corto. En la esquina superior izquierda se muestra un detalle de la flor terminal (flecha). Imagen modificada a partir de (Serrano-Mislata, 2010).

La sobreexpresión de *TFL1* bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell *et al.*, 1985), produce un fenotipo opuesto al del mutante *tfl1*, produciéndose un incremento en la longitud tanto de la fase vegetativa como de la inflorescente (Fig. 1.5) (Ratcliffe *et al.*, 1999). La fase vegetativa en las planta 35S::TFL1 es mucho más larga que en la plantas silvestres, incrementándose mucho el número de

hojas de roseta. La primera fase inflorescente también sufre un alargamiento notable, formándose un número muy elevado de coflorescencias. Los nudos formados al final de esta fase constituyen una nueva fase inflorescente, que no se observa en la planta silvestre, caracterizada por la formación de coflorescencias no sustentadas por hojas caulinares. Estas coflorescencias adquieren características más florales en sentido acropétalo. De esta forma, las plantas 35S::TFL1 acaban por alcanzar la segunda fase inflorescente durante la cual se generan flores que son, aparentemente, normales. Las coflorescencias y las inflorescencias de roseta repiten el patrón de desarrollo de la inflorescencia principal, generándose una planta muy grande y con una arquitectura muy ramificada (Fig. 1.5) (Ratcliffe *et al.*, 1998). En día corto, el incremento en la longitud de las fases del desarrollo de las plantas 35S::TFL1 es aún mayor.

1.3.1. La proteína TFL1.

El gen *TFL1* en *Arabidopsis* pertenece a la familia *FT-TFL1*, la cual está compuesta por seis genes: *FT*, *ATC* (*ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS HOMOLOGUE*), *BFT* (*BROTHER OF FT AND TFL1*) *MFT* (*MOTHER OF FT AND TFL1*), y *TSF* (*TWIN SISTER OF FT AND TFL1*) (Fig. 1.6) (Kardailsky, 1999; Kobayashi, 1999; Mimida *et al.*, 2001). Estos genes codifican proteínas pequeñas, con un tamaño aproximado de 25 KDa, que presentan homología con proteínas de unión a fosfatidiletanolamida (PEBPs) (Bradley *et al.*, 1997; Hanzawa *et al.*, 2005).

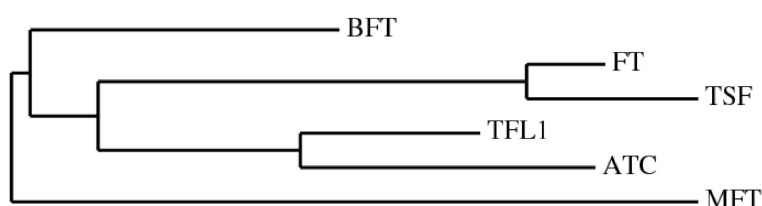


Figura 1.6. La familia FT-TFL1 de Arabidopsis. Árbol filogenético sin raíz construido a partir del alineamiento de secuencias de las proteínas de la familia FT- TFL1 de Arabidopsis. Imagen modificada a partir de Fernández -Nohales, (2011).

Las proteínas PEBPs, que se encuentran en plantas, animales, levaduras y bacterias, regulan rutas de señalización que controlan el crecimiento y la diferenciación. La proteína inhibidora de la Raf quinasa de mamífero (RKIP, Raf kinase inhibitor protein) es el

miembro más estudiado de esta familia (Yeung, 1999). La RKIP es un regulador clave de distintos procesos de señalización celular (Granovski y Rosner, 2008) y un importante supresor de la metástasis en varios tipos de cáncer (Hagan *et al.*, 2006). La estructura de las PEBPs es globular y compacta, lo que les proporciona una amplia superficie para interaccionar con otras proteínas, y tienen un bolsillo de unión a ligando (Granovsky, 2008).

Las proteínas FT y TFL1, a pesar de presentar una homología a nivel de secuencia alta, de un 59%, tienen funciones antagónicas durante el desarrollo de *Arabidopsis*. La mutación en *TFL1* causa adelanto floración y determinación del meristemo inflorescente (Shannon and Meeks-Wagner, 1996; Alvarez *et al.*, 1992; Schulz, 1993; Bradley *et al.*, 1997), y su sobreexpresión retrasa la floración (Ractcliffe *et al.*, 1998). Por el contrario, la mutación en *FT* causa retraso en la floración (Koorneef *et al.*, 1991), y su sobreexpresión la adelanta y provoca la determinación del meristemo inflorescente (Kardailsky, 1999; Kobayashi, 1999).

Las proteínas FT y TFL1 muestran una estructura tridimensional muy similar a la de otras proteínas PEBPs de animales y plantas (Banfield y Brady, 2000). Presentan algunas diferencias entre ellas en la conformación del bolsillo de unión a ligando (Ahn *et al.*, 2006), diferencias que son esenciales para su función bioquímica. Así, la sustitución en TFL1 de una histidina situada en la periferia del bolsillo de unión a ligando por el residuo en la posición equivalente de FT, tirosina, y viceversa, es suficiente para intercambiar, al menos parcialmente, las funciones de las proteínas FT-TFL1 en *Arabidopsis* (Hanzawa *et al.*, 2005). Estos residuos interaccionan con un dominio externo de la proteína que probablemente actúa como una superficie molecular de reconocimiento protéico (Ahn *et al.*, 2006). De esta manera, tanto los residuos junto al bolsillo de unión a ligando como el dominio externo contribuyen a la especificidad funcional de TFL1 y FT, probablemente determinando su capacidad de formar complejos con otras proteínas.

El trabajo de Sohn *et al.* (2007), mostró que TFL1 participa en el transporte de proteínas a un tipo especial de vacuolas, exclusivas de plantas, denominadas PSVs (protein storage vacuoles), las cuales constituyen almacenes protéicos. De acuerdo con esta función, en ese trabajo se observó la localización de la proteína TFL1 en la membrana plasmática, el tonoplasto y en algunos tipos de vesícula citosólicas. No obstante, hasta el momento no se ha conseguido dilucidar la posible relación de esa actividad de TFL1 y su

función en el control la arquitectura de la inflorescencia. Por otro lado, los resultados de Conti y Bradley (2007) indican una localización citoplasmática de la proteína TFL1, lo que estaría más acorde con una hipotética función de TFL1 regulando cascadas de señalización celular.

Por otra parte, se ha mostrado que FT funciona como inductor de la floración a través de su interacción con el factor de transcripción, de tipo bZIP, FD. FT actuaría como un cofactor transcripcional en el complejo FT-FD, que activa la transcripción de genes florales clave, tales como *SOC1*, *API* y *FUL* (Abe *et al.*, 2005; Teper- Bamnolker y Samach, 2005; Wigge *et al.*, 2005). La proteína FD también es capaz de interactuar con TFL1 (Pnueli *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Hanano y Goto, 2011) y el trabajo de Hanano y Goto (2011) indica que TFL1 ejerce su función como represor de la floración actuando como un modulador negativo de la transcripción de los genes diana de FD (Hanano y Goto, 2011).

1.3.2. Patrón de expresión de *TFLI*.

El gen *TFLI* muestra un patrón de expresión único entre los genes de Arabidopsis. En estadios iniciales del desarrollo de la planta, el RNA mensajero (mRNA) de *TFLI* se expresa débilmente en el centro del meristemo vegetativo (Fig. 1.7A) y más tarde, con la transición floral, el nivel de expresión aumenta considerablemente, aunque manteniéndose siempre en el centro del meristemo inflorescente, sin sufrir grandes cambios, durante el resto del desarrollo (Fig. 1.7A) (Bradley *et al.*, 2007; Conti and Bradley, 2007).

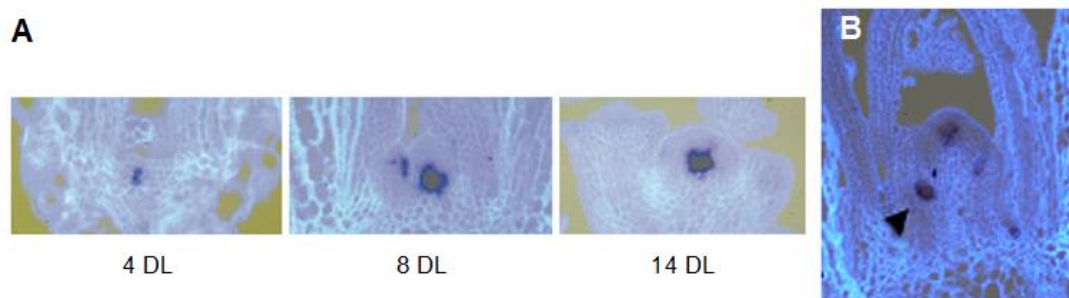


Figura 1.7. Patrón de expresión de *TFLI* en plantas silvestres de Arabidopsis, ecotipo Col, cultivadas en día largo. A) Hibridaciones *in situ* en secciones de ápices recogidos a diferentes tiempos, con *TFLI* como sonda. Imagen modificada a partir de Bradley *et al.* (1997). DL: días de cultivo en día largo. 4 DL corresponde a un meristemo vegetativo, mientras que 8 DL y 14 DL corresponden a meristemos inflorescentes. B) Hibridación *in situ*, utilizando *TFLI* como sonda, de un ápice inflorescente a día 12. La flecha señala la expresión en un meristemo axilar joven, donde la expresión de *TFLI* se observa en todas las células del meristemo. Imagen modificada a partir de Conti y Bradley (2007). En todas las imágenes la expresión de *TFLI* aparece como un precipitado azul oscuro.

La expresión de *TFLI* también se observa en los meristemos axilares. Durante el desarrollo vegetativo del meristemo axilar, el mRNA de *TFLI* se detecta en todo el primordio (Fig. 1.7 B). Luego, cuando se inicia el desarrollo reproductivo en el ápice del tallo axilar, su expresión queda restringida al centro del meristemo, con un patrón de expresión es similar al del ápice principal (Bradley *et al.*, 2007; Conti and Bradley, 2007).

A pesar de su expresión restringida a centro del meristemo del tallo, la actividad de *TFLI* afecta a todas las células del meristemo inflorescente. Probablemente esto es posible gracias al movimiento de su proteína, que se encuentra localizada en todo el meristemo, excepto en los primordios florales (Conti and Bradley, 2007).

Trabajos recientes muestran que *TFLI* también se expresa en el tallo de la inflorescencia, asociado al floema, (Serrano- Mislata, 2010) y en raíz (Sohn *et al.*, 2007). Por otro lado, las bases de datos de micromatrices, tales como BAR (Bio-Array Resorce) y AVT (AtGenExpress Visualization Tool), indican que *TFLI* también se expresa en estructuras florales como carpelos y silicuas, aunque a niveles muy bajos, no siendo detectable a través de hibridación *in situ*.

1.4. Regulación de la expresión *TFLI*.

A pesar de la importante función de *TFLI* en el control de la arquitectura de la inflorescencia, y de que los fenotipos de su pérdida de función y de su sobreexpresión indican que su patrón de expresión es clave para su función, el conocimiento sobre la regulación de la expresión de *TFLI* y de las rutas genéticas que la controlan es muy limitado.

1.4.1. Regulación de *TFLI* por las rutas inductoras de la floración.

El incremento de los niveles de *TFLI* en plantas que sobreexpresan *CO* sugiere que la ruta del fotoperiodo activa la expresión de *TFLI* (Simon *et al.*, 1996 ; Serrano-Mislata, 2010;). Resultados de nuestro laboratorio indican que esta activación podría estar mediada por los factores de transcripción SOC1 y AGL24 (Fig. 1.8A) (Serrano-Mislata, 2010).

1.4.2. Regulación de *TFL1* por los genes de identidad del meristemo floral.

Los genes de identidad del meristemo *LFY* y *AP1* presentan un patrón de expresión complementario a *TFL1* (Fig. 1.8B). De esta manera, mientras *TFL1* se expresa en el centro del meristemo inflorescente (Bradley *et al.*, 1997) los genes *LFY* y *AP1* se expresan en los meristemos florales, los cuales se forman en la periferia del meristemo inflorescente (Mandel *et al.*, 1992 ; Weigel *et al.*, 1992). La represión mutua entre *TFL1* y los genes de identidad de meristemo floral aparentemente mantiene el patrón de expresión complementario de estos genes (Fig. 1.8B).

De acuerdo con este modelo, el hecho de que en el mutante *tfl1* los meristemos inflorescentes se conviertan en florales se debe a que en ausencia de *TFL1* la expresión de los genes *LFY* y *AP1* se expande a todo el ápice (Weigel *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1993; Gustafson- Brown, 1994). Por tanto, la presencia de *TFL1* en el meristemo inflorescente evita su determinación, impidiendo que los genes de identidad de meristemo floral se expresen en este meristemo.

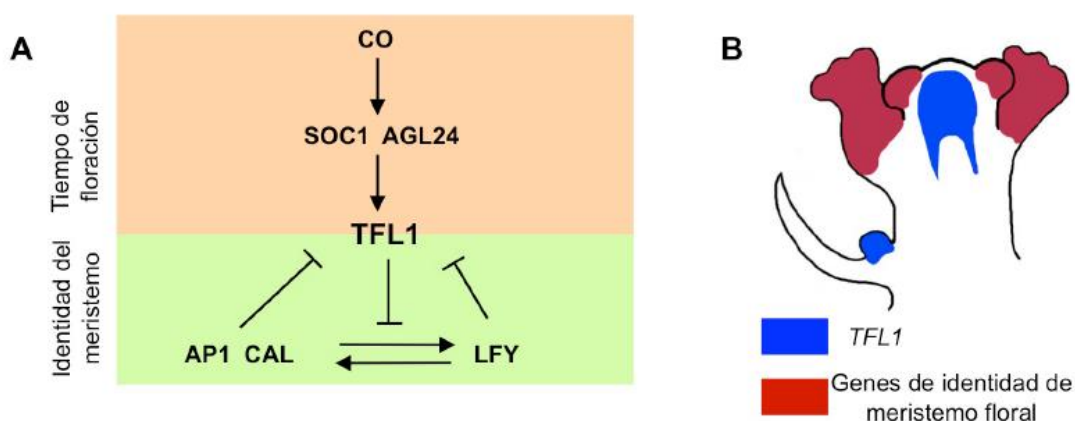


Figura 1.8. Control de la expresión de *TFL1*. A) Esquema que resume los datos conocidos sobre la regulación de *TFL1* por las rutas genéticas implicadas en el desarrollo de la inflorescencia de Arabidopsis. *TFL1* actúa como un punto de conexión de dos procesos clave en el desarrollo de Arabidopsis al ser controlado por las rutas genéticas inductoras de la floración, concretamente por la ruta dependiente del fotoperiodo (posiblemente a través de SOC1 y AGL24, que son activados por CO), así como por los genes de identidad del meristemo floral. →: interacción positiva. ⊥: interacción negativa. B) Diagrama que representa una sección longitudinal de un ápice inflorescente de Arabidopsis donde se representan los dominios aproximados de expresión de *TFL1* y de los genes de identidad de meristemo floral. Imagen modificada a partir de Fernández-Nohales (2011).

La sobreexpresión constitutiva de *LFY* o *AP1* suprime en gran manera la expresión de *TFL1* en el ápice (Liljegren *et al.*, 1999; Ratcliffe *et al.*, 1999), dando lugar a plantas con fenotipos similares al del mutante *tfl1* (Mandel y Yanofsky, 1995; Weigel y Nilsson, 1995). Recientemente se ha visto que *LFY* y *AP1* reprimen la expresión de *TFL1* de forma

directa, y tanto LFY como AP1 se unen a elementos del promotor de *TFL1* (Kaufman *et al.*, 2010; Moyroud *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011).

Por otra parte, las plantas 35S::TFL1 producen gran cantidad de inflorescencias (Ratcliffe *et al.*, 1998), coincidiendo con el hecho de que la sobreexpresión de *TFL1* retrasa mucho la inducción de *AP1* y *LFY*. Aún así, las plantas 35S::TFL1 terminan produciendo flores viables, ya que la sobreexpresión de *TFL1* no bloquea totalmente la expresión de los genes de identidad del meristemo floral (Ratcliffe *et al.*, 1998).

Todos estos datos permiten concluir que la represión mutua entre *TFL1* y *LFY/AP1*, es clave para definir el correcto patrón de expresión de *TFL1*, el cual es fundamental para la correcta especificación de los meristemas en el ápice inflorescente y para la arquitectura de la inflorescencia. Esto indica que el patrón de expresión de *TFL1* es esencial para su función.

1.4.3. El promotor de *TFL1*.

El conocimiento de la estructura del promotor de un gen, con los elementos reguladores que contiene, es esencial para entender de la regulación de su expresión.

En los últimos años, en nuestro laboratorio se ha llevado a cabo un análisis funcional detallado del promotor de *TFL1*, combinando diferentes aproximaciones que incluye identificación de secuencias conservadas, análisis de delecciones (complementación y fusiones a GUS) y análisis de líneas de inserción de T-DNAs (Serrano- Mislata, 2010; Fernández-Nohales, 2011). Los resultado de este análisis han mostrado que todos los elementos necesarios para la correcta expresión de *TFL1* se hallan contenidos un fragmento que incluye 0.3 kb de la región 5' y 3.6 kb de la región 3' del gen.

Los resultados obtenidos indican que los elementos reguladores presentes en la región 5' controlan el nivel de expresión de *TFL1*, mientras que elementos de la región 3' controlan diferentes aspectos relacionados con el patrón espacio-temporal de la expresión de *TFL1* (Serrano-Mislata, 2010).

1.4.4. Reguladores directos de la expresión de *TFL1*.

Como se ha mencionado anteriormente, hasta el momento, sólo se ha identificado como reguladores directos de la expresión de *TFL1* a LFY y AP1, que se unen a elementos situados en la región 3' de *TFL1*, posiblemente reprimiendo su expresión en los meristemas florales (Kaufman *et al.*, 2010; Moyroud *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011). El complejo patrón de expresión espacio-temporal de *TFL1* sugiere que tiene que haber otros factores que regulan la expresión de *TFL1*, por ejemplo factores relacionados con su activación durante la transición floral, con su expresión en la vasculatura de la inflorescencia, etc.

Con el objeto de identificar nuevos reguladores directos de la expresión de *TFL1*, en nuestro laboratorio Pedro Fernández-Nohales llevó a cabo escrutinios en el sistema de híbrido-simple de levaduras para identificar proteínas capaces de unirse a regiones del promotor de *TFL1* importantes para su regulación.

En ese trabajo se identificó, por ejemplo, a la proteína TCP7, de la familia de factores de transcripción tipo TCP (Martín-Trillo y Cubas, 2010), como capaz de unirse a un fragmento de la región 3' de *TFL1*. El fragmento utilizado en el escrutinio contenía la secuencia de un sitio de unión para factores TCP, que se halla conservado en el promotor de *TFL1* de diferentes brasicáceas y cuya presencia es esencial para la unión de TCP7 en esa región. También se observó que la expresión de TCP7 en el ápice del tallo muestra solapamiento con la de *TFL1*. Por último, se mostró que plantas de *Arabidopsis* 35S::TCP7 que sobreexpresan TCP7 de manera constitutiva muestran una disminución de los niveles de *TFL1* y un fenotipo de retraso en la floración y defectos en la arquitectura de la inflorescencia, tales como la determinación de algunas coflorescencias en flores terminales (Fernández-Nohales, 2011).

En ese mismo escrutinio también se identificó a la proteína VOZ1, cuyo análisis funcional es el objeto de esta tesis.

1.5. Las proteínas VOZ.

La proteína VOZ1 fue identificada originalmente por Mitsuda *et al.* (2004), por su capacidad de unirse, en el sistema de híbrido simple, al promotor del gen *AVP1* de

Arabidopsis (que codifica una H⁺-pirofosfatasa vacuolar), a un elemento regulador implicado en su expresión durante el desarrollo del polen.

Mitsuda et al. mostraron que *VOZ1* constituye, junto con su homólogo *VOZ2*, una pequeña familia génica con homólogos (normalmente dos en cada especie) en plantas vasculares y en *Physcomitrella patens*. Así mismo, mostraron que los genes *VOZ* se expresan en tejido vascular y codifican nuevos factores de transcripción con dos regiones conservadas que denominaron dominio A y dominio B (Fig. 1.9). El dominio B está altamente conservado entre las proteínas *VOZ* de diferentes plantas y lo denominaron dominio *VOZ*. Este dominio *VOZ* contiene un motivo Zinc-finger (de ahí el nombre de los genes: *VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER*, *VOZ*) y una región básica conservada.

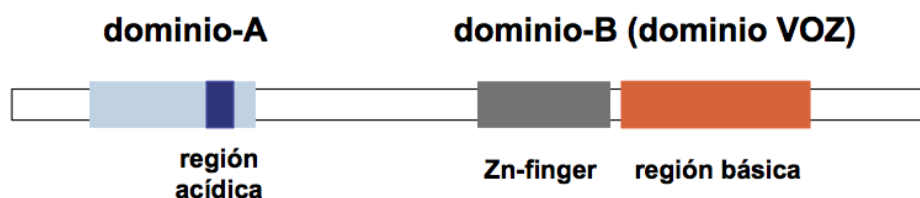


Figura 1.9. Esquema de la estructura de las proteínas *VOZ*.

El estudio de la proteína *VOZ2* permitió mostrar que ésta se une como un dímero a una secuencia palindrómica, GCGTN7XACGC, presente en el elemento del promotor de *AVP1*, y que la unión ocurre a través del dominio-*VOZ*, que participa en la unión a DNA y en la dimerización (Mitsuda *et al.*, 2004).

Estudios posteriores han propuesto la inclusión de las proteínas *VOZ* como un subgrupo dentro de la familia de factores de transcripción tipo NAC, basándose en que las proteínas *VOZ* contendrían un dominio NAC divergente representado por la región básica (Olsen *et al.*, 2005). De acuerdo con esto, se ha visto que la proteína *VOZ2* es capaz de unirse a una secuencia consenso de unión de los factores de transcripción NAC (Jensen *et al.*, 2010).

Hasta muy recientemente (ver el final de esta sección) no se ha dispuesto de datos que informen de la función biológica de las proteínas *VOZ*. Recientemente se identificó a *MdVOZ1*, el homólogo de *VOZ1* de manzano, como capaz de interactuar en el sistema de doble híbrido con *MdFT2*, uno de los homólogos a FT de manzano (Mimida *et al.*,

2011); estos datos sugieren la posibilidad de que las proteínas VOZ pudieran participar en el control de la floración.

1.6. Objetivos de este trabajo.

El objetivo general de este trabajo ha sido entender la función de VOZ1, su posible papel en el control de la arquitectura de la inflorescencia y la floración. Con este fin se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- 1- Entender en detalle la interacción de la proteína VOZ1 con el promotor de *TFL1*.
- 2- Elucidar la función biológica de *VOZ1*, especialmente su posible papel en la regulación de la arquitectura de la inflorescencia y la floración.
- 3- Entender a través de qué regulador(es) de la floración actúa VOZ1.

Nota:

Durante la redacción de esta memoria han aparecido varias publicaciones sobre la función de las proteínas VOZ en *Arabidopsis* (Nakai *et al.*, 2012; Nakai *et al.*, 2013; Yasui *et al.*, 2012); algunos datos de estas publicaciones confirman parte de los resultados que se presentan en esta tesis. Los resultados y conclusiones de esos trabajos se discuten en la sección de Discusión de esta memoria.

2-RESULTADOS

2.1. Identificación de VOZ1 como posible regulador de *TFL1*.

Con el fin de identificar factores de transcripción capaces de interaccionar con el promotor de *TFL1*, en un trabajo anterior en nuestro laboratorio se realizó un escrutinio, en el sistema de híbrido simple en levadura, de una genoteca de cDNA de planta completa de *Arabidopsis thaliana* (Fernández-Nohales, 2011). Como cebo en el escrutinio se utilizó un fragmento de 414 pb de la región 3' de *TFL1* (fragmento 2.8-3.2; coordenadas 2848-3265 desde el codón de stop de la región codificante del gen *TFL1*; Fig. 2.1A). En estudios previos en nuestro laboratorio se había demostrado que la región 2.8-3.2 del 3' de *TFL1* es esencial para el correcto patrón de expresión del gen (Serrano- Mislata, 2010). Entre los clones positivos obtenidos, tres de ellos contenían un fragmento de cDNA del gen AT1G28520, que codifica la proteína VOZ1 (VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER; Mitsuda *et al.*, 2004) (Fig. 2.1).

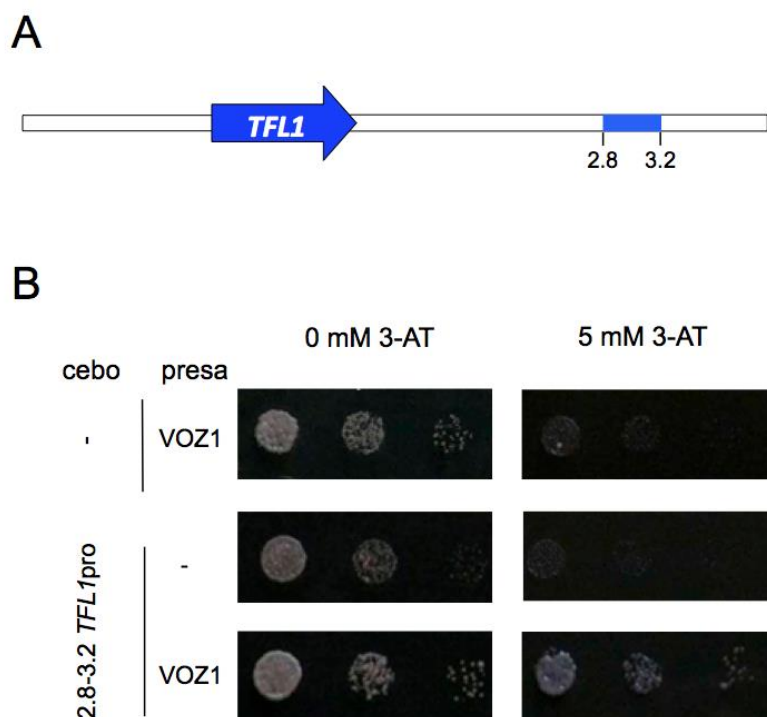


Figura 2.1. VOZ1 se une a la región 2.8-3.2 *TFL1*pro en un ensayo de híbrido simple. (A) Esquema de la región genómica de *TFL1*, indicando el fragmento utilizado como cebo en el escrutinio de híbrido simple. (B) Crecimiento del clon positivo con el cDNA de *VOZ1* en el ensayo de híbrido simple con el fragmento 2.8-3.2. Las levaduras se incubaron durante una semana a temperatura ambiente, en placas con 0 mM ó 5 mM de 3AT. Insertos en el vector cebo: -, vector cebo sin inserto (control negativo); 2.8-3.2 *TFL1*pro, vector cebo con el fragmento 2.8-3.2 de la región 3' de *TFL1*. Insertos en el vector presa: -, vector presa sin inserto (control negativo); *VOZ1*.

Estos resultados indican que *VOZ1* se une al promotor de *TFL1*, lo que sugiere la posibilidad de que *VOZ1* actúe como un regulador de *TFL1*.

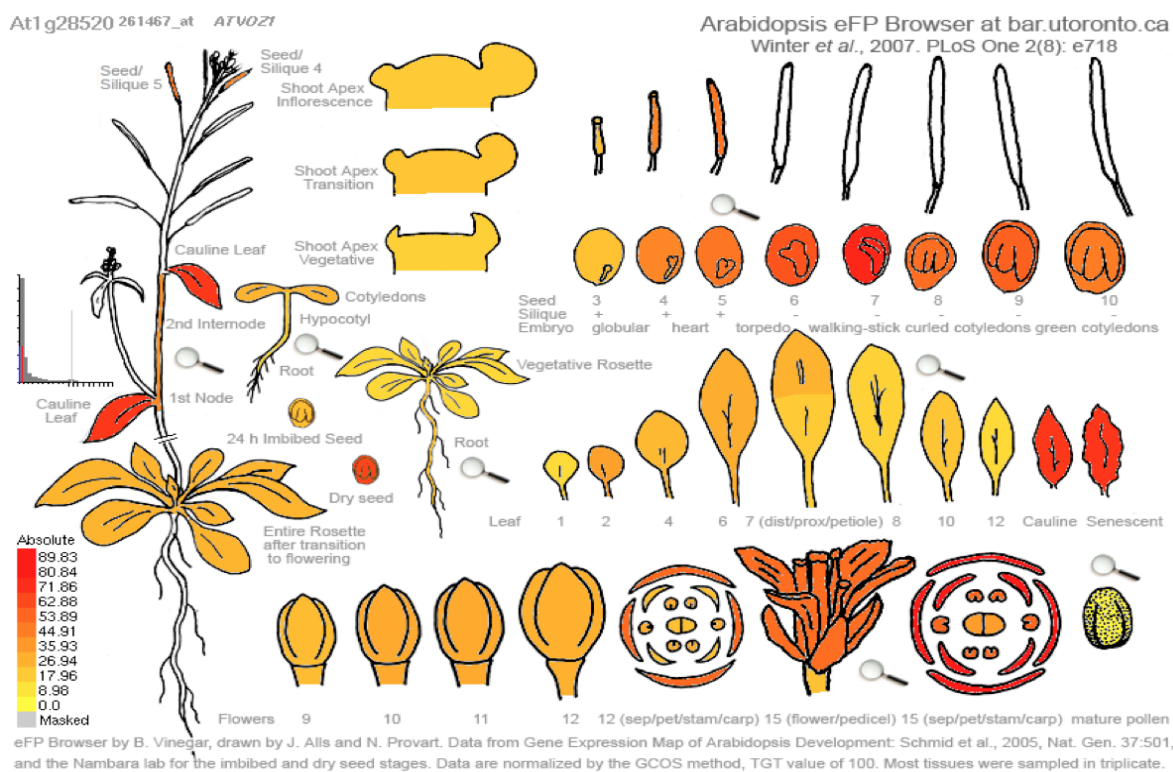
2.2. Patrón de expresión del gen *VOZ1*.

Como inicio de la caracterización de *VOZ1* se estudió su patrón de expresión en *Arabidopsis*.

2.2.1. Distribución del mRNA de *VOZ1* en distintos tejidos de la planta.

En una primera aproximación al análisis de la expresión del gen *VOZ1* en diferentes tejidos de *Arabidopsis* se recurrió a la base de datos “Bio-Array Resource” (BAR) (Schimid *et al.*, 2005; Winter *et al.*, 2007), que almacena datos de expresión derivados de análisis transcriptómico con micromatrices de DNA.

Figura 2.2. Patrón de expresión de *VOZ1* descrito en la base de datos BAR, de micromatrices de DNA. El código de intensidades de color indica el nivel relativo, en escala logarítmica, de la expresión de *VOZ1* a lo largo del desarrollo de



diferentes órganos. Los colores cálidos indican niveles de expresión superiores a la media de todos los tejidos, mientras que los colores fríos indican niveles de expresión inferiores a la media.

Los datos del BAR indican que *VOZI* se expresa en todos los tejidos de la planta. Una vez ocurrida la transición floral, se observa un ligero aumento de la expresión de *VOZI* en algunos órganos de la planta, como en las hojas caulinares, especialmente en su senescencia, flores y silicuas, así como en la semilla en desarrollo, manteniéndose un nivel de expresión alto en la semilla seca. En el meristemo apical del tallo la expresión es relativamente baja y no se observan cambios en los niveles de expresión de *VOZI* después de la transición floral (Fig. 2.2).

Por otra parte, procedimos a determinar los niveles del mRNA de *VOZI* en diferentes órganos de la planta, mediante RT- qPCR. Nuestro análisis mostró que *VOZI* se expresa en todos los tejidos analizados, observándose que los niveles de expresión de *VOZI* son más altos en tallo, hoja caulinar y fruto joven (Fig. 2.3), lo cual coincide con los resultados publicados por la base de datos BAR (Fig. 2.2).

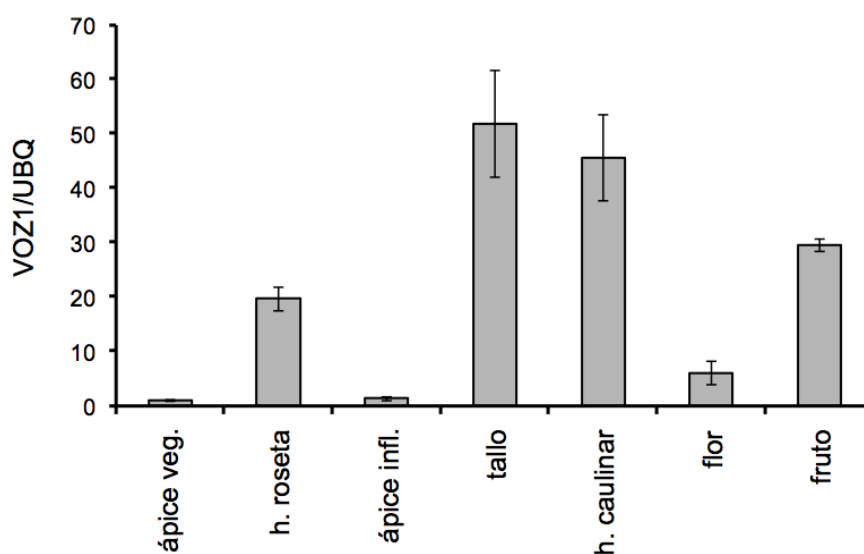


Figura 2.3. Expresión de *VOZI* en diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana*. Niveles de expresión de *VOZI* en diferentes tejidos de la *Arabidopsis* (Col-0), determinados mediante RT- qPCR. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error, la desviación estándar entre ellas. Como gen constitutivo de referencia se utilizó la *UBI10*. ápice veg, ápice vegetativo; ápice infl, ápice de inflorescencia; h. caulinar, hoja caulinar.

2.2.2. Análisis de la expresión de *VOZI* por hibridación *in situ*.

Con el objetivo de analizar con mayor detalle el patrón de expresión de *VOZI* en ápices vegetativo e inflorescente de *Arabidopsis*, se empleó hibridación *in situ* de RNA, utilizando una sonda específica para el mRNA del gen *VOZI*.

La hibridación *in situ* mostró expresión de *VOZ1* en el centro del meristemo apical del tallo, tanto en el ápice vegetativo como en el inflorescente, así como en la vasculatura del tallo (Fig. 2.4), similar a la expresión descrita para el gen *TFL1*. No obstante, a diferencia de *TFL1*, también se observó expresión de *VOZ1* en primordios de hojas, en la vasculatura de hojas adultas y en los órganos florales (Fig. 2.4).

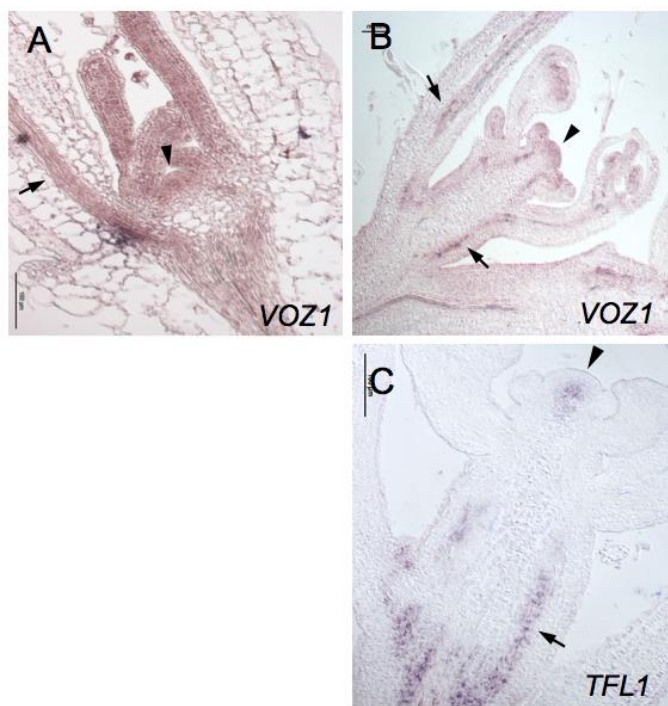


Figura 2.4. Análisis del patrón de expresión de *VOZ1* y *TFL1* por hibridación *in situ*. (A) Sección de un ápice vegetativo de una planta de *Arabidopsis*, Col-0, de 8 días hibridada con una sonda de *VOZ1*. Puede apreciarse señal en el meristemo apical del tallo, en los primordios de hoja y en la vasculatura de una hoja en expansión (B) Sección de un ápice inflorescente en bótting hibridada con una sonda de *VOZ1*. La señal aparece en el centro del meristemo apical del tallo, en la vasculatura del tallo y de la hoja y en órganos florales (C) Sección de un ápice inflorescente hibridada con una sonda de *TFL1*. La señal aparece en el centro del meristemo apical del tallo, en las yemas axilares y en la vasculatura del tallo. Puntas de flecha: meristemo apical; flechas: vasculatura de la hoja o del tallo de inflorescencia.

Estos resultados muestran un solapamiento parcial de los dominios de expresión de *VOZ1* y *TFL1*, lo que es compatible con la idea de que *VOZ1* pudiese ser un regulador de *TFL1*.

2.2.3. Análisis del patrón de expresión de *VOZ1* mediante una línea transgénica reportera p*VOZ1*:GUS.

Para poder llevar a cabo un análisis más completo del patrón de expresión espacio – temporal de *VOZ1* en *Arabidopsis* se decidió generar una línea transgénica reportera con una construcción en la que el promotor del gen *VOZ1* dirige la expresión del gen *GUS*.

Para generar esta construcción, VOZ1pro::GUS, un fragmento de aproximadamente 3.5 Kb de la región 5' aguas arriba del gen *VOZ1* (desde el final del gen anterior hasta el nucleótido anterior al ATG de *VOZ1*) se fusionó al gen *GUS* en el vector pMDC163 (Fig. 2.5). Se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Col-0) con esta construcción y se seleccionaron líneas homocigotas de dos de esas plantas, que mostraban el patrón de expresión que se observaba en la mayor parte de las plantas T1.

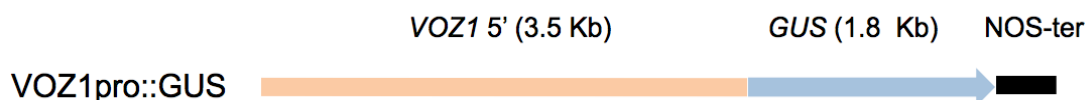


Figura 2.5. Esquema de la construcción VOZ1pro::GUS utilizada para estudiar el patrón de expresión de *VOZ1*. En la construcción VOZ1pro::GUS se fusionó un fragmento de 3.5 Kb de la región 5' aguas arriba del ATG del gen *VOZ1* al gen reportero *GUS*. Se representa el promotor de *VOZ1* (en naranja), el gen *GUS* (en azul claro) y el terminador del gen *NOS* (en negro)

Una de esas líneas se utilizó para analizar con detalle el patrón de expresión de la construcción VOZ1pro::GUS. El análisis de plantas en distintos estadios de desarrollo mostró la expresión de VOZ1pro::GUS desde las primeras fases del desarrollo. Se detectó expresión de *GUS* en todos los órganos de la planta: raíz, tallo, hojas, flores..., en particular, en la vasculatura de los mismos (Fig. 2.6).

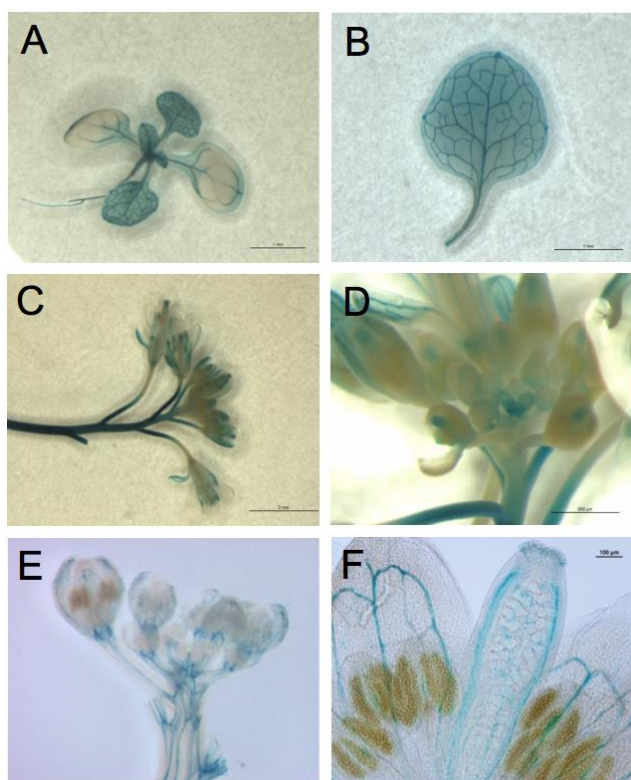


Figura 2.6. Patrón de expresión de VOZ1pro::GUS. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de *VOZ1*. (A). Plántula con cotiledones y primeras hojas verdaderas. La señal se observa en la raíz, en los

cotiledones y en las hojas. **(B)** Detalle de una hoja de roseta. La señal se observa en la vasculatura. **(C)** Inflorescencia principal. La señal se observa en el tallo y en las flores. **(D)** Detalle de la inflorescencia. Se observa señal en el tallo, los pedicelos y las flores, y también en el ápice de la inflorescencia. **(E)** Inflorescencia tratada con hidrato de cloral. Se observa que la señal del tallo y los pedicelos se localiza en la vasculatura. **(F)** Detalle de una flor, tratada con hidrato de cloral.

Por otra parte, los resultados de la hibridación *in situ* mostraban un solapamiento parcial entre el patrón de expresión de *VOZ1* y el de *TFL1*. Para confirmar este resultado, decidimos realizar cortes histológicos de ápices de inflorescencia en bolting, tanto de plantas de la línea *VOZ1pro::GUS* como de plantas de la línea delatora *TFL1pro::GUS*. La comparación de ambos tipos de secciones confirmaron lo observado en la hibridación *in situ*, mostrando un solapamiento parcial de los patrones de *VOZ1pro::GUS* y de *TFL1pro::GUS*, cuya expresión coincide en el meristemo apical del tallo y en la vasculatura del tallo de la inflorescencia (Fig. 2.7).

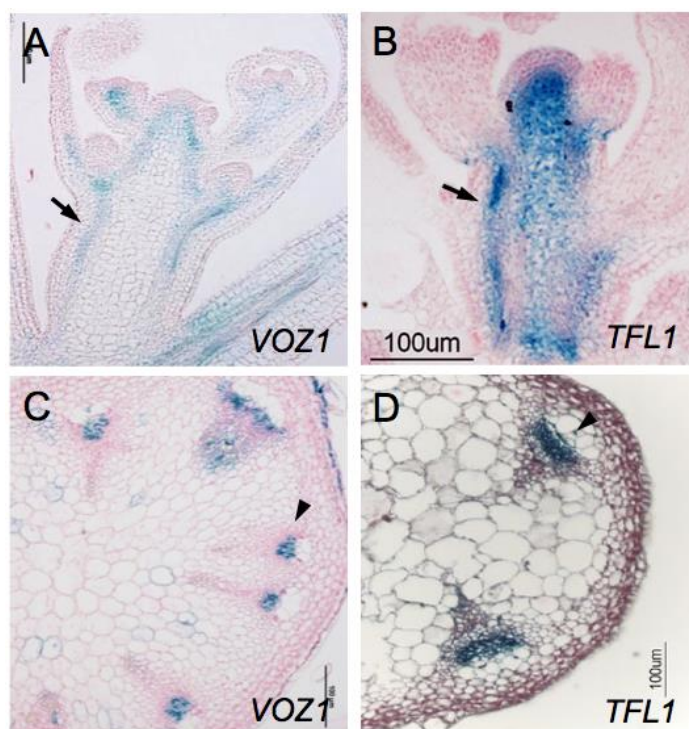


Figura 2.7. Comparación de los patrones de expresión de *VOZ1pro::GUS* y *TFL1pro::GUS*. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de *VOZ1* y por el promotor de *TFL1*. **(A)** Corte histológico de un ápice de inflorescencia en bolting de la línea transgénica *VOZ1pro::GUS*. **(B)** Corte histológico de un ápice de inflorescencia en bolting de la línea transgénica en *TFL1pro::GUS*. **(C)** Sección transversal del tallo de una inflorescencia de *VOZ1pro::GUS*. **(D)** Sección transversal del tallo de una inflorescencia de *TFL1pro::GUS*. Flechas: señal en la vasculatura del tallo; puntas de flecha: señal en el floema.

Así mismo, decidimos analizar con mayor detalle la expresión de las construcciones *VOZ1pro::GUS* y *TFL1pro::GUS* en la vasculatura del tallo de la inflorescencia, para lo que se realizaron cortes histológicos transversales del tallo de la inflorescencia de plantas de las correspondientes líneas reporteras. El análisis de dichas secciones mostró que en

ambos caso la expresión del gen reportero *GUS* se localiza en la vasculatura, específicamente en el floema (Fig. 2.7).

En resumen, estos resultados indican que el gen *VOZ1* se expresa en todos los órganos de la planta, especialmente en la vasculatura de los mismos. Así mismo, indican que hay un solapamiento parcial en los dominios de expresión de *VOZ1* y *TFL1*, lo que apoya la idea de que *VOZ1* pueda actuar como un regulador de *TFL1*.

2.3. Análisis de la localización subcelular de la proteína VOZ1.

Continuando con la caracterización de *VOZ1*, se procedió a analizar la localización subcelular de su proteína. Para estudiar la localización subcelular de la proteína *VOZ1*, se generó la construcción 35S::YFP-*VOZ1*, en la que la región codificante (CDS) del cDNA del gen *VOZ1* (desde el ATG al codón de parada) se fusionó al extremo C-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP), bajo el control del promotor constitutivo 35S (Fig. 2.8).

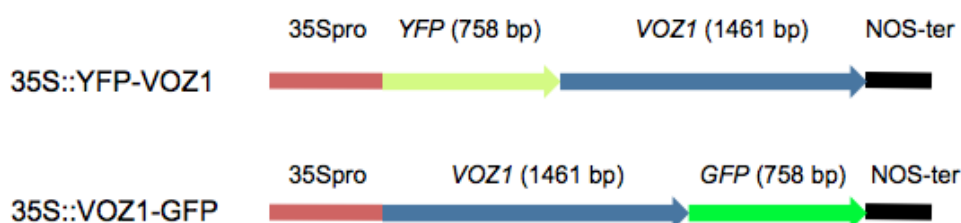


Figura 2.8. Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar el patrón de localización subcelular de la proteína VOZ1. En la construcción 35S::YFP-*VOZ1* se fusionó la región codificante del cDNA del gen *VOZ1* al extremo C-terminal de la proteína YFP y en la construcción 35S::*VOZ1*-YFP la región codificante de *VOZ1* se fusionó al extremo N-terminal de la proteína YFP. Se representa el promotor 35S (en rojo), el gen *YFP* (en amarillo), el gen *GFP* (en verde), la CDS del gen *VOZ1* (en azul) y el terminador del gen *NOS* (en negro); se indica el tamaño relativo de los genes.

La construcción 35S::YFP-*VOZ1* se utilizó para agroinfiltrar hojas de *Nicotiana bentamiana*, para conseguir la expresión transitoria del transgén *YFP-VOZ1*. En la Figura 2.9 se muestra el patrón de localización subcelular de la proteína YFP-*VOZ1*; la fluorescencia se detectó con igual intensidad en el núcleo y en el citoplasma.

Así mismo, se generó una segunda construcción para la localización subcelular de *VOZ1*, la construcción 35S::*VOZ1*-GFP, fusionando la CDS de *VOZ1* al extremo N-terminal de la proteína fluorescente verde (GFP) (Fig. 2.8). La construcción 35S::*VOZ1*-GFP también se utilizó para agroinfiltrar hojas de *Nicotiana bentamiana* y en este caso el

patrón de localización subcelular observado fue el mismo que cuando el cDNA de *VOZ1* está fusionado al C-terminal de la proteína YFP (Figura 2.9).

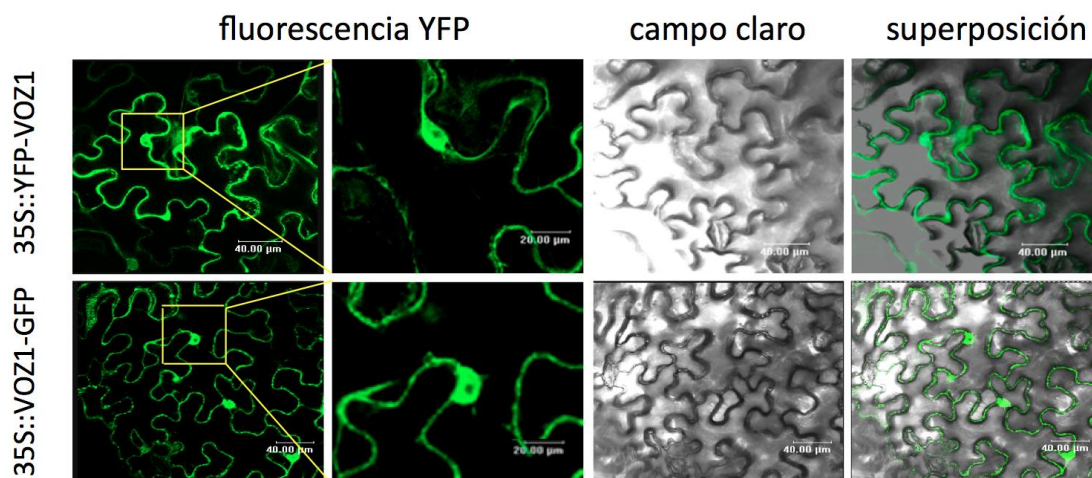


Figura 2.9. Localización subcelular de la proteína VOZ1 en *Nicotiana benthamiana*. Se muestran imágenes de microscopía confocal de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* que se infiltraron hojas con la construcción 35S::YFP-VOZ1 o con 35S::VOZ1-GFP.

Para analizar la localización subcelular de la proteína VOZ1 en *Arabidopsis thaliana* se generaron plantas transgénicas con la construcción 35S::YFP-VOZ1 y se seleccionó una línea transgénica homocigota. Para determinar la localización de la proteína YFP-VOZ1 se analizaron en el microscopio confocal raíces de plantas de ésta línea, puesto que en las raíces la ausencia de clorofila facilita la observación de la fluorescencia en las células. Al igual que en los experimentos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, la fluorescencia de la YFP se detectó en el núcleo y en el citoplasma (Fig. 2.10), aunque en este caso la intensidad de la fluorescencia fué mayor en el núcleo.

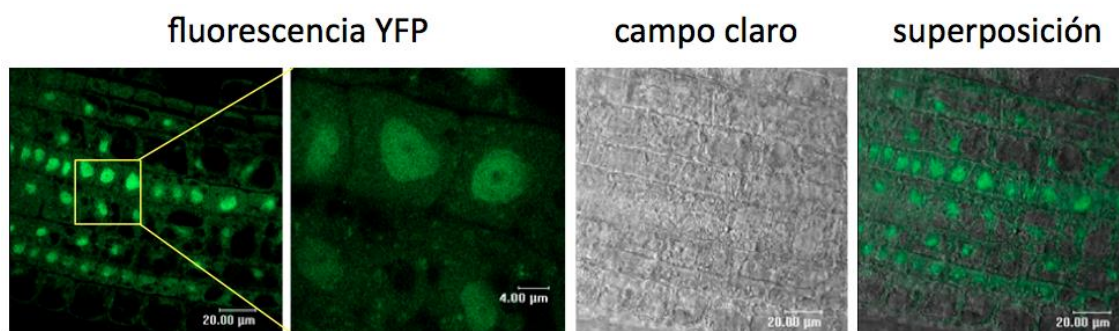


Figura 2.10. Localización subcelular de la proteína VOZ1 en *Arabidopsis*. Se muestran imágenes de microscopía confocal de raíces de plantas de 14 días de una línea de *Arabidopsis* transformada con la construcción 35S::YFP-VOZ1.

Estos resultados indican que la proteína VOZ1 se halla localizada en el núcleo y en el citoplasma, aunque los datos de expresión en transgénicas estables de *Arabidopsis*

indican que la localización se da preferencialmente en el núcleo. Estos resultados concuerdan con la idea de que la proteína VOZ1 actuó como un factor de transcripción.

2.4. Interacción de VOZ1 con el promotor de *TFL1*.

2.4.1. Interacción de VOZ1 con el promotor de *TFL1* en el ensayo de activación de la luciferasa.

Para determinar si la unión de la proteína VOZ1 al promotor de *TFL1* observada en células de levadura, en el sistema de híbrido simple, también ocurre en células vegetales, se analizó la capacidad de VOZ1 de activar la expresión del promotor de *TFL1* en el ensayo de activación transitoria de la luciferasa (Hellens *et al.*, 2005).

Para estos experimentos se generó la construcción TFL1pro::LUC (Fig. 2.11), en la que el promotor de *TFL1* dirige la expresión del gen de la luciferasa de luciérnaga (*LUC*). Para ello, las regiones 5' (2.2 Kb) y 3' (4.5 Kb) de *TFL1* se clonaron en el vector pGII0800-LUC (Hellens *et al.*, 2005), flanqueando el gen *LUC*. En el mismo vector se localiza el gen de la luciferasa *Renilla* (*REN*) bajo el control del promotor constitutivo 35S, que se utiliza como referencia para normalizar los datos de expresión (Fig. 2.11).

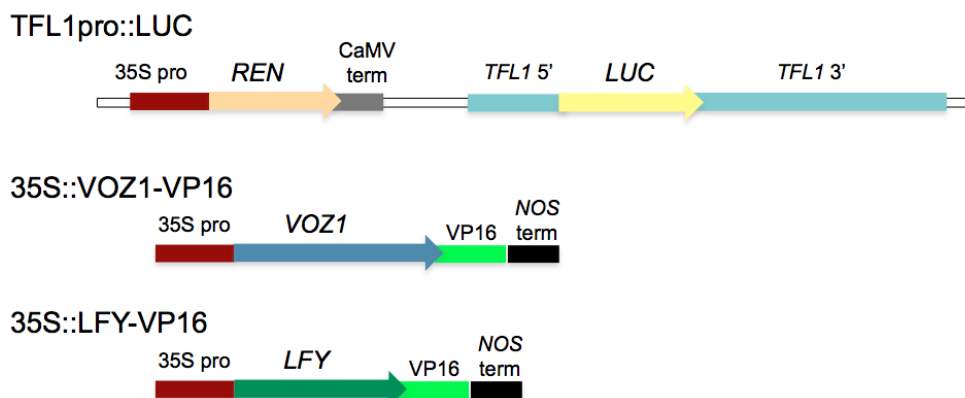


Figura 2.11. Esquema de las construcciones utilizadas en los ensayos de activación de la luciferasa por VOZ1. En la construcción TFL1pro::LUC las regiones 5' y 3' del gen *TFL1* se clonaron flanqueando al gen de la luciferasa de luciérnaga (*LUC*) en el vector pGII 0800-LUC, que también contiene el gen de la luciferasa *Renilla* (*REN*) dirigido por el promotor 35S. En la construcción 35S::LFY-VP16 el dominio activador VP16 se fusionó al extremo C-terminal de la región codificante del cDNA de *LFY*, y en la construcción 35S::VOZ1-VP16 el dominio activador VP16 se fusionó al C-terminal de la región codificante de *VOZ1*. Se representa el promotor 35S (en rojo), las regiones 5' y 3' del gen *TFL1* (en celeste), el terminador CaMV (en gris), el terminador del gen *NOS* (en negro), el gen *REN* (en naranja), el gen *LUC* (en amarillo), la CDS del gen *LFY* (en verde oscuro), la CDS del *VOZ1* (en azul) y el dominio VP16 (en verde claro).

En los experimentos, se infiltraba esta construcción en hojas de *Nicotiana bentamiana*, junto con la construcción 35S::VOZ1-VP16 (Fig. 2.11), y se analizaba si la expresión transitoria de la proteína VOZ-VP16 activaba la expresión del gen *LUC*, que se detectaba midiendo la actividad de la luciferasa. La fusión a VP16 nos permitiría detectar la activación del promotor de *TFL1* por la proteína VOZ1, haciéndola independiente de factores que pudiera necesitar para comportarse como activador transcripcional, y, en el caso de que no los necesitase, también podríamos obtener una activación más potente. Como control positivo de unión al promotor de *TFL1* se utilizó la construcción 35S::LFY-VP16, ya que se conoce que la proteína LFY se une al promotor de *TFL1* (Moyroud *et al.*, 2011). Así mismo, como controles negativos se infiltraron el vector vacío pGII0800-LUC y la construcción TFL1pro::LUC (Fig 2.12).

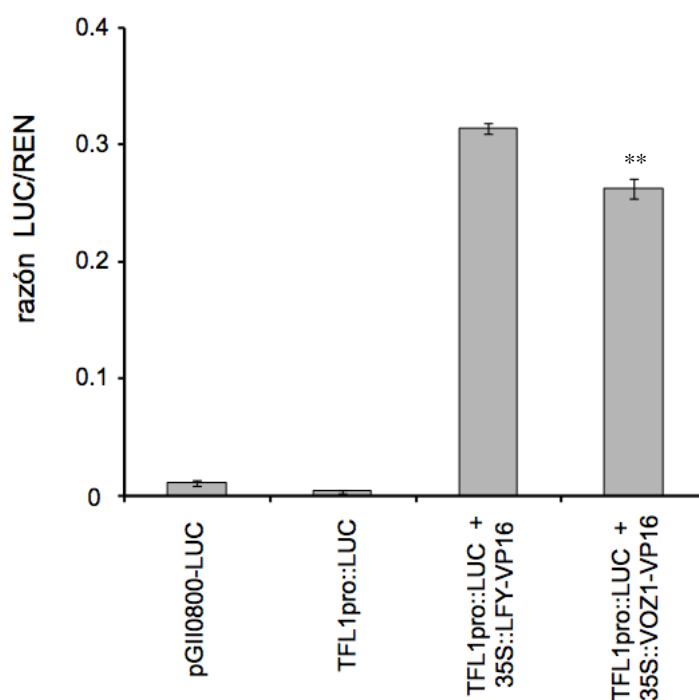


Figura 2.12. Activación transitoria del promotor de *TFL1* por la proteína VOZ1. Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana bentamiana* con las combinaciones de plásmidos indicadas en la gráfica. Transcurridos tres días, se cuantificó en un luminómetro la señal emitida por la proteína LUC y por la RENILLA (control interno) y se representó el ratio LUC/REN. Como controles negativos se utilizaron hojas infiltradas con el vector vacío o sólo con la construcción TFL1pro::LUC. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. ** $P < 0,001$

Los experimentos mostraron que tanto las hojas infiltradas con 35S::VOZ1-VP16 como las infiltradas con 35S::LFY-VP16 mostraban actividad luciferasa, mientras que no la mostraron las hojas infiltradas sólo con la construcción TFL1pro::LUC o con el vector vacío (Fig 2.12).

Estos resultados indican que la proteína VOZ1 es capaz de unirse al promotor de *TFL1* en células vegetales, lo que apoya la idea de que VOZ1 pueda tener un papel como regulador de *TFL1 in vivo*.

2.4.2. Mapeo del sitio de unión de VOZ1 al promotor de *TFL1*.

El rastreo por híbrido simple mostró que VOZ1 se une al fragmento 2.8-3.2 de la región 3' del promotor de *TFL1*. Puesto que este fragmento es de gran longitud (414 pb), decidimos acotar con más precisión la región donde VOZ1 se une dentro de ese fragmento.

Para delimitar más el sitio en el cual VOZ1 se une a la región 2.8-3.2 del promotor de *TFL1*, decidimos analizar la interacción de VOZ1 con distintos fragmentos de esta región mediante ensayos de híbrido simple. Para ello generamos cuatro construcciones con cuatro fragmentos solapantes que cubren la región 2.8-3.2 (Fig. 2.13A). Esos fragmentos se fusionaron al gen *HIS3* del vector pHISi, generando así cuatro construcciones que se utilizaron como cebo para realizar el experimento. Así mismo, se clonó la región codificante del cDNA de *VOZ1* en el plásmido PGDT7rec, el cual fue utilizado como presa.

En los ensayos de híbrido simple se observó que sólo las levaduras que contenían la construcción con el fragmento completo, 2.8-3.2, o la construcción con el fragmento F1 (de 112 pb, coordenadas 2854-2966) fueron capaces de crecer en medio sin histidina suplementado con 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) (Fig. 2.13B).

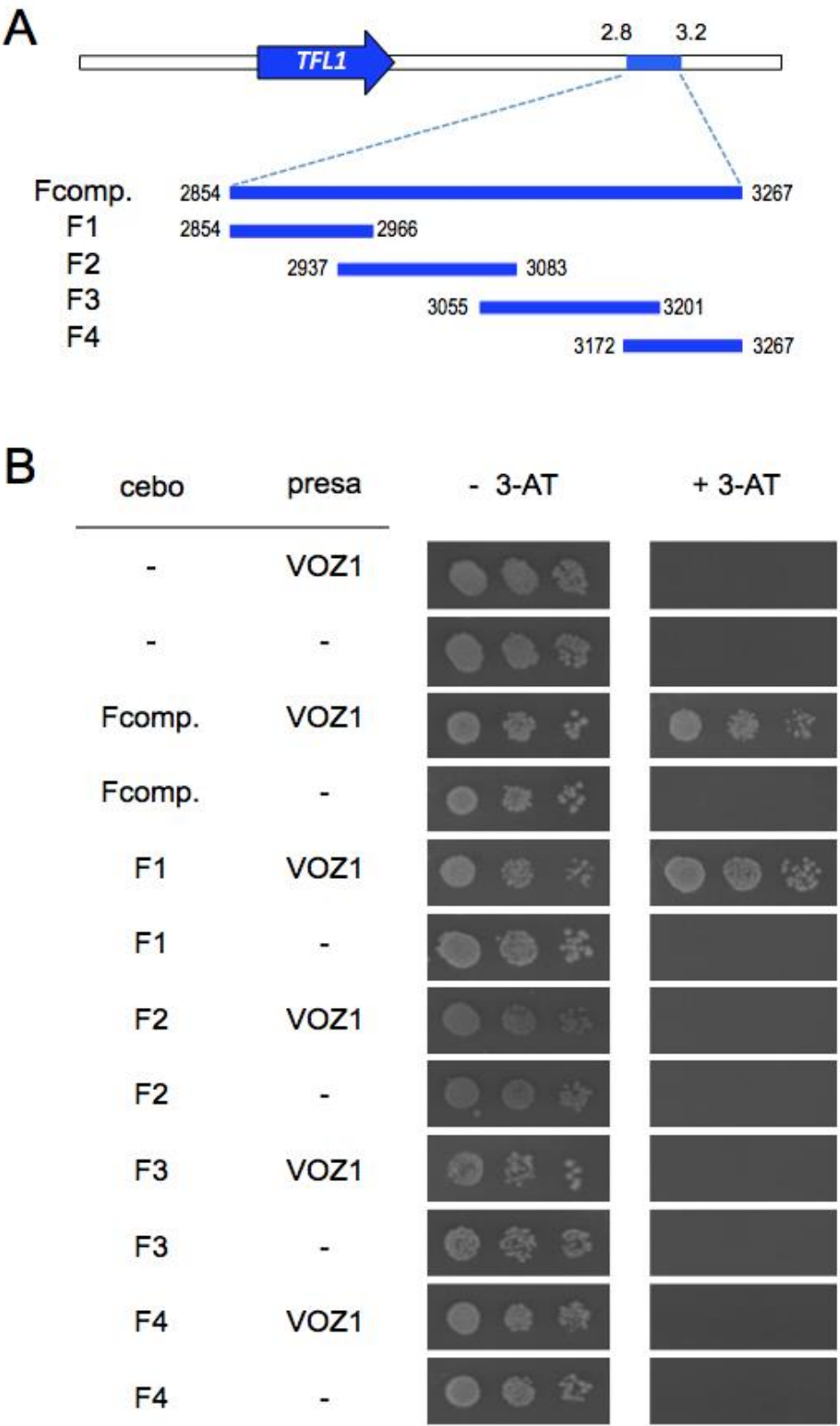


Figura 2.13. Mapeo del sitio de unión de VOZ1 en la región 2.8-3.2 del promotor de *TFL1* mediante ensayos de híbrido simple. (A) Esquema de la región genómica de *TFL1*, indicando el fragmento utilizado como cebo en el rastreo de híbrido simple y los fragmentos utilizados en el mapeo del sitio de unión de VOZ1. **(B)** Crecimiento de los clones de levadura transformados con diferentes combinaciones de vector cebo y vector presa. Las levaduras se incubaron durante una semana a 28° C en placas con o sin 3AT. Insertos en el vector cebo: -, vector cebo sin inserto (control negativo); Fcomp. - F4, diferentes fragmentos de la región 2.8-3.2, como se describen en (A). Insertos en el vector presa: -, vector presa sin inserto (control negativo); VOZ1.

Estos resultados confirman de nuevo que la proteína VOZ1 se une a la región de 2.8-3.2 de la región 3' del promotor de *TFL1*, y, puesto que se observa unión al fragmento F1 (coordenadas 2854-2966) pero no al F2 (coordenadas 2937-3083), muestran que la secuencia con la que VOZ1 interacciona en híbrido simple corresponde a una región de 82 pb comprendida entre las coordenadas 2854-2936.

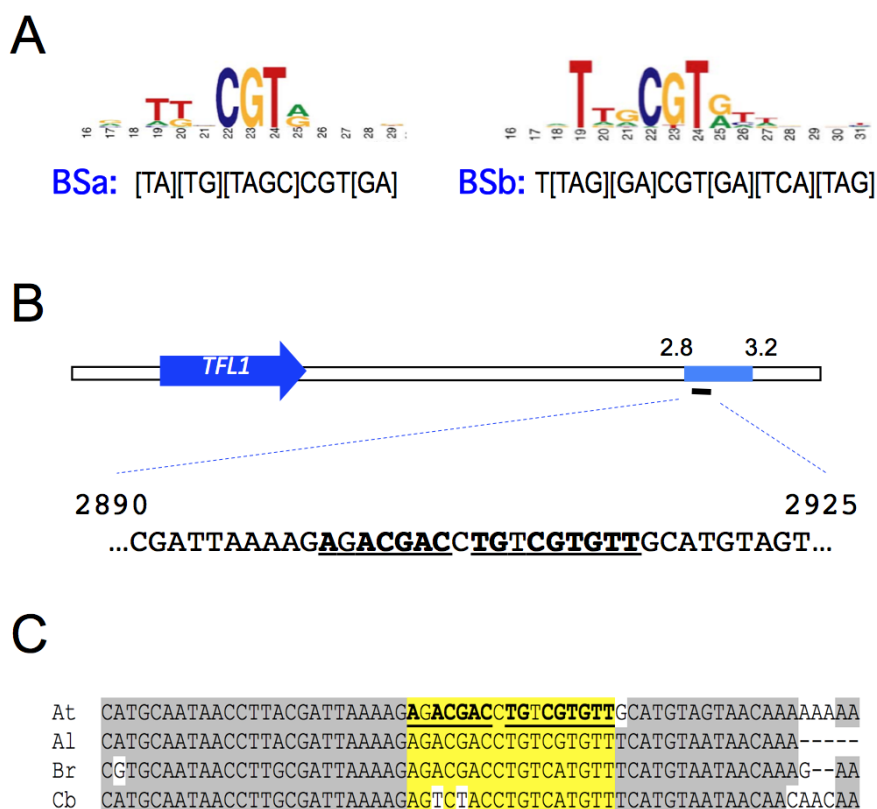


Figura 2.14. Presencia y conservación de un motivo de unión de factores de transcripción tipo NAC en el fragmento 2.8-3.2 del 3' de *TFL1*. (A) Secuencias consenso de unión de los factores de transcripción tipo NAC (modificado de Olsen *et al.*, 2005). (B) Secuencia con homología al consenso de unión de los factores de transcripción NAC en la región donde se une VOZ1, en híbrido simple, en el fragmento 2854-2936 de *TFL1*. La secuencia en sentido directo (subrayada) coincide casi perfectamente con el consenso BSb. La secuencia en reverso-complementario (subrayada) también coincide parcialmente con el consenso BSb y puede formar un palíndromo con la otra secuencia. (C) Fragmento del alineamiento de las secuencias de la región 3' de los ortólogos a *TFL1* en diferentes brasicáceas (Fernández-Noales, 2011). La secuencia de unión de factores NAC (en amarillo) se halla muy conservada, dentro en una región también muy conservada. At: *Arabidopsis thaliana*; Al: *Arabidopsis lyrata*; Br: *Brassica rapa*; Cb: *Capsella bursa-pastoris*.

En el análisis de la región de 82 pb en la que se une VOZ1 no se encontró ninguna secuencia con similitud a la secuencia consenso determinada como sitio de unión al DNA de la proteína VOZ2 (Mitsuda *et al.*, 2004). Sin embargo, sí se encontró una secuencia, parcialmente palindrómica, que coincide con una de las secuencias consenso determinadas como sitio de unión al DNA de los factores de transcripción de la familia NAC (Fig.

2.14A-B) (Jensen *et al.*, 2010; Olsen *et al.*, 2005). Además, ese motivo se encuentra conservado entre las secuencias de la región 3' de los genes ortólogos a *TFL1* de las especies de brasicáceas *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa* y *Capsella bursa-pastoris* (Fig. 2.14C).

Estos resultados sugieren que VOZ1 se une al motivo de unión NAC presente en el fragmento 2.8-3.2 de la región 3' de *TFL1*.

2.4.3. Unión de VOZ1 al promotor de *TFL1* mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Nuestros resultados muestran que la proteína VOZ1 es capaz de unirse al promotor de *TFL1*. Esta unión la observamos tanto en levadura, en ensayos de híbrido simple, como en planta, en ensayos de activación de la luciferasa utilizando *Nicotiana benthamiana*. Para determinar si la unión de la proteína VOZ1 al promotor de *TFL1* también ocurría *in vivo* en *Arabidopsis* decidimos realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Para los experimentos de ChIP, puesto que no disponíamos de un anticuerpo contra la proteína VOZ1, decidimos utilizar la línea transgénica 35S::YFP-VOZ1 descrita en el apartado 2.3 y anticuerpos comerciales que reconocen a la proteína YFP. Por otra parte, como control negativo, se utilizó una línea transgénica 35S::VOZ1. Como se muestra en el apartado 2.6.2, ambas líneas mostraban un fenotipo esencialmente idéntico. Tras la inmunoprecipitación de la cromatina, el enriquecimiento de ésta en secuencias del promotor de *TFL1* se analizó mediante RT-qPCR. Se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos que amplificaban dos fragmentos de los extremos de la región 2.8-3.2 del promotor de *TFL1*, los fragmentos TFL1-1, que solapa con el fragmento F1, y TFL1-2, que solapa con el fragmento F4, (Figs. 2.13A y 2.15B), y, como control negativo del experimento, también se utilizó una pareja de oligonucleótidos que amplificaban un fragmento de la región codificante del gen *TFL1*, el fragmento TFL1-c (Fig. 2.15B).

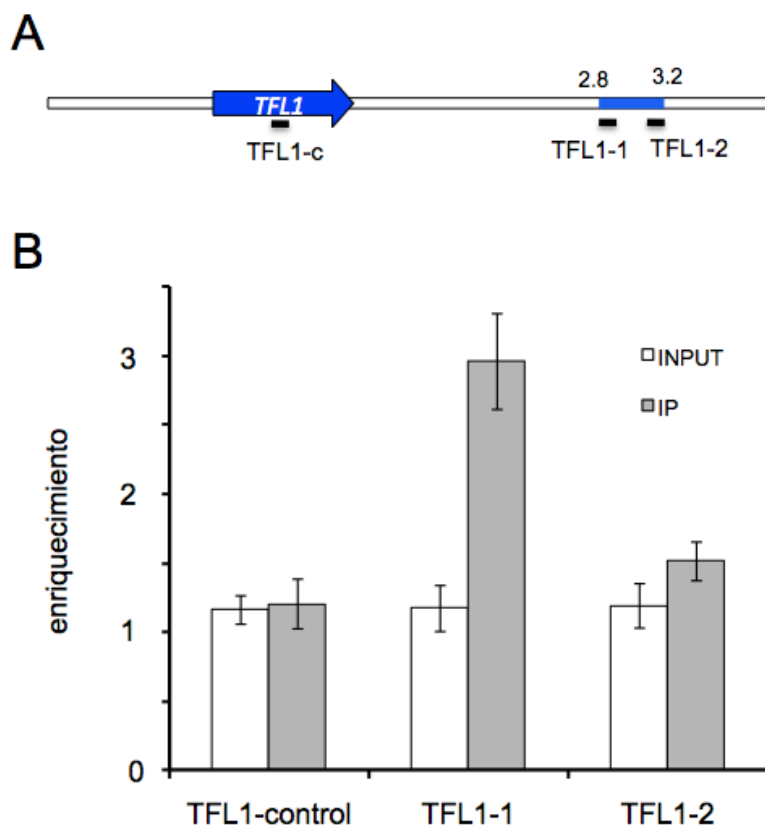


Figura. 2.15. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de VOZ1 sobre el promotor de *TFL1*. Resultados de un experimento realizado con cromatina de plántulas enteras que se cultivaron durante 15 días en día largo. (A) Representación esquemática de las regiones genómicas analizadas en el experimento de ChIP sobre el promotor de *TFL1*. (B) Enriquecimientos obtenidos en cada región. Las barras blancas representan el material de partida (INPUT) y las barras grises los enriquecimientos obtenidos en cada región analizada, las inmunoprecipitaciones (IP). Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar.

Se llevaron a cabo dos experimentos de ChIP independientes, uno de ellos con cromatina procedente de plántulas de 15 días y el otro de ápices de inflorescencia en bolting, y en ambos casos se observó un enriquecimiento similar del fragmento TFL1-1, mientras que no se observó enriquecimiento de los otros dos fragmentos (Fig. 2.15). Es de destacar que el fragmento enriquecido, TFL1-1 de 150 pb, solapa con el fragmento F1 en el que se determinó que se da la unión de VOZ1 por híbrido simple y que contiene la pareja de sitios NAC conservados (apartado 2.4.2).

Estos resultados indican que la proteína VOZ1 se une *in vivo* al promotor de *TFL1*, en el extremo 3' de la región 2.8-3.2, posiblemente en el sitio de unión para factores NAC, y apoyan fuertemente la idea de que VOZ1 actúe como un regulador de la expresión de *TFL1*.

2.5. Análisis fenotípico de los mutantes de los genes *VOZ*.

Con la finalidad de estudiar la función de los genes *VOZ* en *Arabidopsis*, y poder determinar de esta manera si estos tienen alguna función en el control de la arquitectura de la inflorescencia y/o la floración, se procedió a la caracterización del fenotipo causado por su pérdida de función.

2.5.1. Aislamiento de mutantes de inserción para los genes *VOZ*.

Para disponer de alelos mutantes de pérdida de función de los genes *VOZ*, se buscaron mutantes de inserción de T-DNA de los genes *VOZ1* y *VOZ2* en diferentes colecciones públicas.

Para el gen *VOZ1* se utilizó una línea de inserción que pertenece a la colección de Wisconsin DsLox T-DNA, la línea WISC-489-492O10. Según la información de base de datos, se trata de una línea con una inserción de T-DNA al final del segundo exón del gen *VOZ1*; a este alelo mutante se le denominó *voz1-1* (Fig. 2.16).

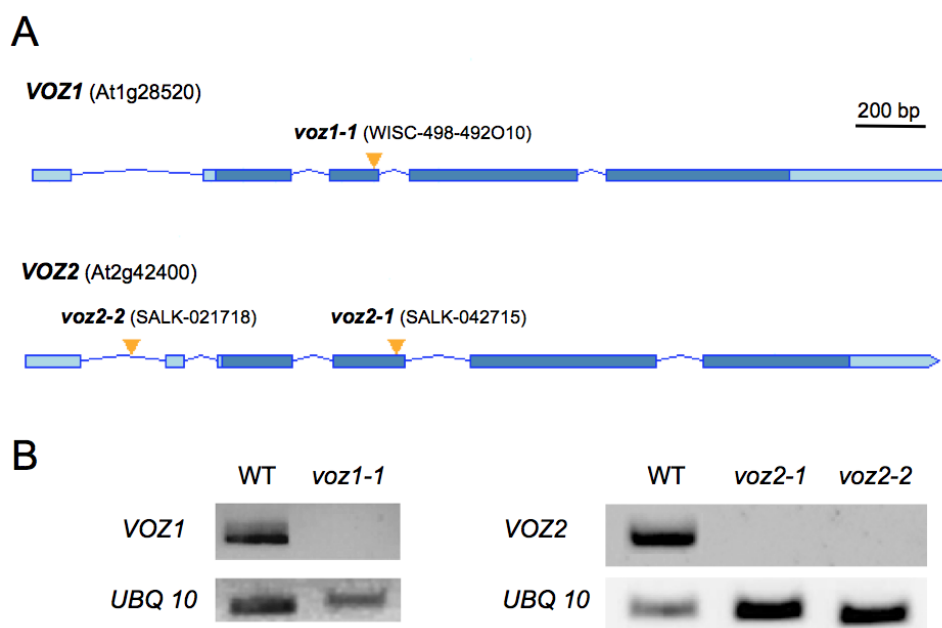


Figura 2.16. Mutantes de inserción de T-DNA en los genes *VOZ1* y *VOZ2*. (A) Diagrama de la localización de las inserciones según la información disponible en el TAIR para los mutantes *voz1* y *voz2*. Representación esquemática de los genes *VOZ1* y *VOZ2*. Los triángulos naranja representan el punto donde se encuentran las inserciones. (B) Análisis por RT-PCR semicuantitativa de los niveles de transcrito de los genes *VOZ1* y *VOZ2* en los distintos alelos mutantes de inserción, en donde se amplificó en cada caso la región codificante completa. Como control interno se utilizó el gen constitutivo *UBIQUITINA 10*. Se utilizaron plántulas de día 12 tras la germinación, crecidas en condiciones de día largo.

Para el gen *VOZ2* se utilizaron dos líneas de inserción, ambas pertenecientes a la colección de líneas de T-DNA del SALK Institute. Una de las líneas es la SALK-042715, que contiene una inserción de T-DNA al final del segundo exón de *VOZ2*; a este alelo mutante se le denominó *voz2-1* (Fig. 2.16). La segunda línea utilizada, la línea SALK-021718, contiene una inserción de T-DNA en el primer intrón de la región 5'UTR; a este alelo mutante se le denominó *voz2-2* (Fig. 2.16).

De cada una de las tres líneas de inserción de T-DNA en los genes *VOZ* se aisló una línea homocigota; esas líneas homocigotas son las que se utilizaron en los experimentos posteriores.

Para determinar el efecto de las inserciones en la transcripción de cada uno de los genes, se utilizó RT-PCR semicuantitativa, mediante la cual cuantificamos en cada línea el nivel del transcrito del gen correspondiente. Los resultados obtenidos en este análisis sugieren que tanto el mutante *voz1-1* como los mutantes *voz2-1* y *voz2-2* son alelos nulos de estos genes (Fig. 2.16).

2.5.2. Fenotipo de floración de los mutantes *voz*.

Al analizar la morfología de plantas de los mutantes simples *voz1-1*, *voz2-1* y *voz2-2* no observamos ningún fenotipo evidente, sino que todas las plantas presentaban un fenotipo muy similar a las plantas de la línea silvestre Columbia-0 (Fig. 2.17).

El no observar ningún fenotipo evidente en los mutantes simples, nos hizo pensar que quizás los genes *VOZ1* y *VOZ2* pudiesen presentar una función redundante. Para contrastar esta hipótesis decidimos generar el doble mutante, para lo que realizamos cruces entre los distintos alelos mutantes de los genes *VOZ1* y *VOZ2*.

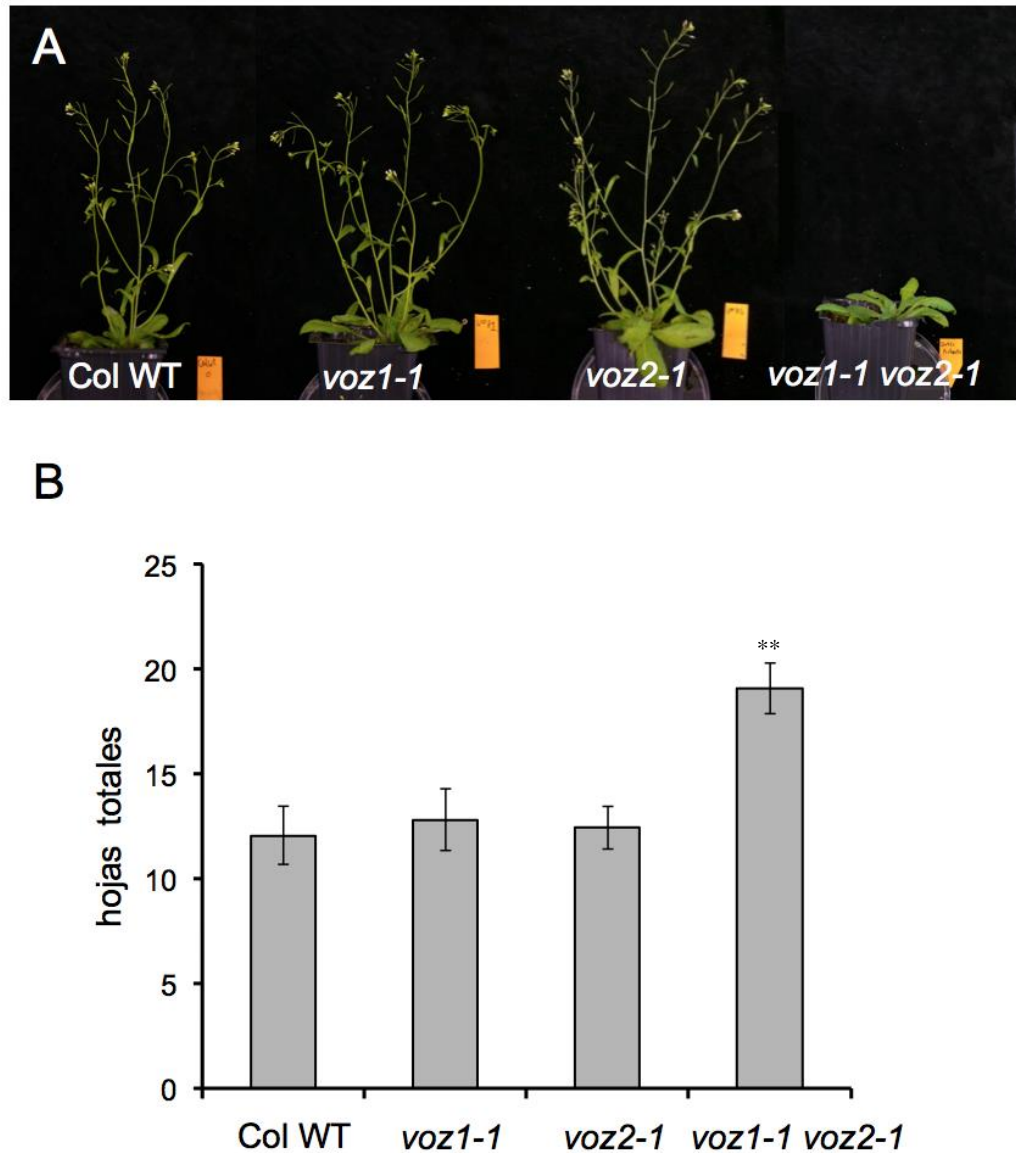


Figura 2.17. Fenotipo de floración de los mutantes simples *voz1* y *voz2* y del doble mutante. (A) Plantas de la línea silvestre (Col-0), de los mutantes simples *voz1-1* y *voz2-1*, y del doble mutante *voz1-1 voz2-1*, cultivados en condiciones de día largo durante 36 días la germinación. (B) Número de hojas producidas por el tallo principal de los mutantes simples *voz1-1* y *voz2-1* y del doble mutante, cultivados en condiciones de día largo n = 16 por genotipo. Los datos representan la media \pm desviación estándar. ** $P < 0.001$.

A diferencia de los mutantes simples, los dobles mutantes mostraron un fenotipo evidente de floración. El análisis del tiempo de floración en los mutantes, estimado como el número de días que tarda en producirse la elongación del tallo de la inflorescencia principal ("bolting") y por el número total de hojas que produce el tallo principal antes de producir la primera flor, indicó que los dobles mutantes muestran un claro retraso en el tiempo de floración respecto a las plantas de la línea silvestre Col-0 y a los mutantes simples *voz1* y *voz2* (Fig. 2.17 y Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Tiempo de floración en día largo de mutantes de los genes *VOZ1* y *VOZ2*.

Genotipo	Hojas de roseta ^{a, b}	Hojas caulinares ^{a, c}	Hojas totales ^{a, d}	Días de bolting ^{a, e}
silvestre (Col-0) ^f	9.6 ± 1.0	2.6 ± 0.5	12.0 ± 1.4	18.0 ± 1.3
silvestre (Col-0), 23°C ^f	9.1 ± 1.0	2.5 ± 0.5	11.5 ± 1.2	17.3 ± 1.6
<i>voz1-1</i> ^f	10.3 ± 1.1	2.5 ± 0.6	12.8 ± 1.5	18.6 ± 1.8
<i>voz2-1</i> ^f	9.9 ± 1.1	2.5 ± 0.5	12.4 ± 1.0	17.4 ± 1.3
<i>voz2-2</i>	9.2 ± 0.9	2.3 ± 0.6	11.5 ± 1.0	16.9 ± 1.3
<i>voz1-1 voz2-1</i> ^f	15.0 ± 1.1	4.1 ± 0.9	19.0 ± 1.0	38.5 ± 1.1
<i>voz1-1 voz2-2</i>	14.5 ± 0.1	4.2 ± 0.9	18.75 ± 1.4	37.9 ± 1.6

a, Cada valor representa la media ± desviación estándar. Para todos los genotipos se analizaron al menos 16 plantas cultivadas en condiciones estándar de día largo. **b**, Número de hojas de roseta. **c**, número de hojas caulinares del tallo principal. **d**, número total de hojas (roseta + caulinares) producidas por el tallo principal. **e**, Número de días desde germinación hasta que el tallo de inflorescencia elongó hasta un tamaño de ≈ 0.5 cm. **f**, Todos los genotipos se cultivaron a 21°C, salvo el mutante *voz2-2* y el doble *voz1-1 voz2-1*, que se cultivaron a 23°C.

Nuestro análisis mostró que ese retraso en el tiempo de floración ocurre tanto en el doble mutante *voz1-1 voz2-1* como en el doble *voz1-1 voz2-2*. No obstante, en el doble mutante *voz1-1 voz2-2* no observamos el fenotipo de retraso de floración en nuestras condiciones estándar de crecimiento, 21°C y día largo (16h de luz y 8h de oscuridad), sino que sólo observamos el retraso cuando las plantas se cultivaron a 23°C; esto indica que el alelo mutante *voz2-2* es termosensible, quizás debido a que la inserción del T-DNA se encuentra en un intrón.

En resumen, estos resultados indican que los genes *VOZ1* y *VOZ2* promueven la floración de manera redundante en condiciones de día largo.

2.5.3. Efecto del fotoperiodo sobre la floración de los mutantes *voz*.

La floración en *Arabidopsis* se halla controlada por la longitud del fotoperiodo, de modo que las plantas cultivadas en día largo florecen antes que las cultivadas en día corto. Para determinar si el fenotipo de floración del mutante *voz1 voz2* depende del fotoperiodo se analizó el efecto del día corto sobre la floración de los mutantes *voz*; para ello se

cultivaron las plantas de los mutantes simples y del doble mutante en condiciones de día corto (8h de luz y 16 h horas de oscuridad).

El análisis del tiempo de floración de los mutantes *voz* y del genotipo silvestre cultivadas en día corto, medido como el número total de hojas producidas por el tallo principal, mostró que tanto las plantas de la línea silvestre, como las de los mutantes simples *voz1* y *voz2*, y las del doble mutante, presentan un retraso notable en la floración respecto a las plantas cultivadas en día largo (Figs. 2.17 y 2.18). Tal como ocurría en condiciones de día largo, las plantas del doble mutante *voz1 voz2* florecieron más tarde que los mutantes simples, que mostraron un tiempo de floración muy similar al de la línea silvestre (Fig. 2.18 y Tabla 2.2).

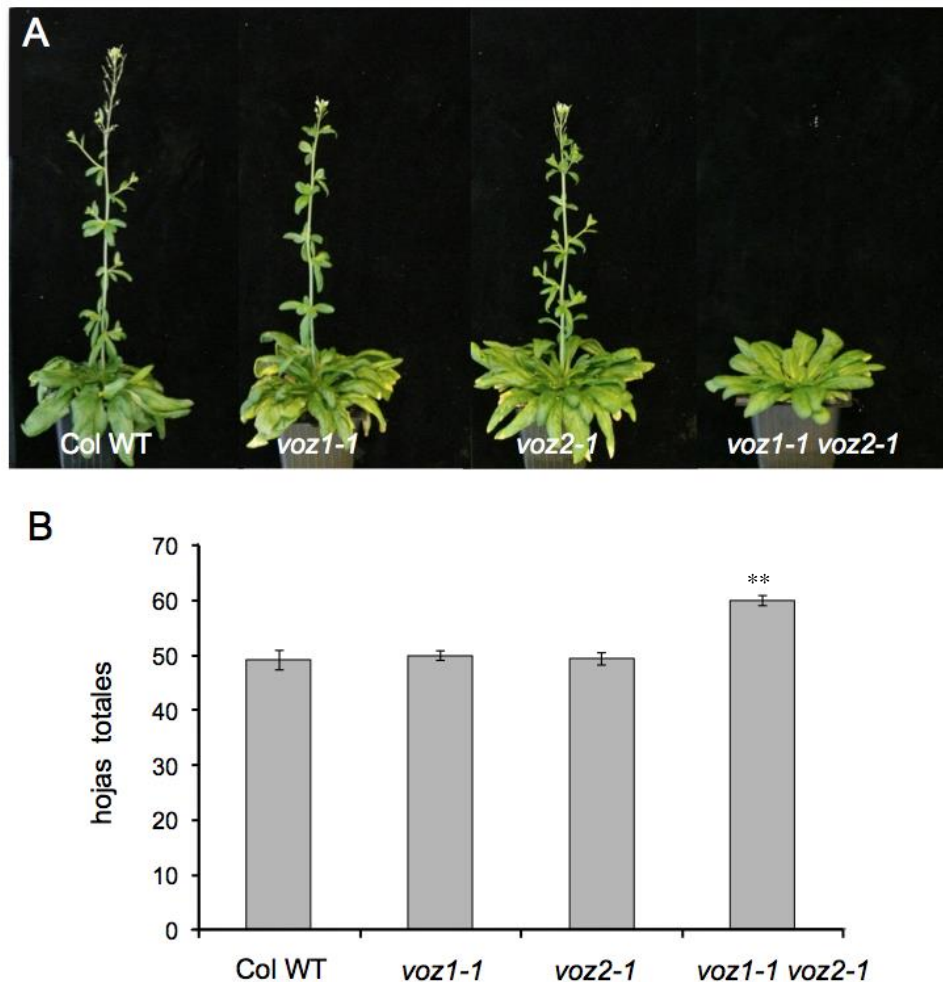


Figura 2.18. Fenotipo de floración de los mutantes simples *voz1* y *voz2* y del doble mutante bajo condiciones de día corto. (A) Plantas de la línea silvestre (Col-0), de los mutantes simples *voz1-1* y *voz2-1*, y del doble mutante *voz1-1 voz2-1*, cultivados en condiciones de día corto. (B) Número de hojas de los mutantes simples *voz1-1* y *voz2-1* y del doble mutante, cultivados en condiciones de corto n=16. Los datos representan la media \pm desviación estándar. ** $P < 0,001$

Tabla 2.2. Tiempo de floración en día corto de mutantes de los genes *VOZ1* y *VOZ2*.

Genotipo	Hojas roseta ^{a, b}	Hojas caulinares ^{a, c}	Hojas totales ^{a, d}
silvestre (Col-0)	45.2 ± 1.5	3.6 ± 0.8	48.9 ± 1.8
<i>voz1-1</i>	45.3 ± 1.4	4.6 ± 0.7	49.9 ± 0.8
<i>voz2-1</i>	45.2 ± 1.3	4.1 ± 0.4	49.3 ± 1.1
<i>voz1-1 voz2-1</i>	55.4 ± 1.1	4.5 ± 0.6	59.9 ± 0.9

a, Cada valor representa la media ± desviación estándar. Para todos los genotipos se analizaron al menos plantas 16 cultivadas en día corto. **b**, Número de hojas de roseta. **c**, número de hojas caulinares del tallo principal. **d**, número total de hojas (roseta + caulinares) producidas por el tallo principal.

En resumen, el doble mutante *voz1 voz2* florece tarde tanto en condiciones de día largo como de día corto, lo que indica que los genes *VOZ* promueven la floración bajo los dos tipos de fotoperiodo.

2.5.4. Efecto de la vernalización sobre la floración de los mutantes *voz*.

Algunos ecotipos de *Arabidopsis* requieren vernalización (exposición prolongada a un largo periodo de frío) para florecer. Aunque los ecotipos Col y Ler, utilizados en este trabajo, no presentan requerimiento de vernalización, y florecen pronto sin necesitar un tratamiento de frío, las mutaciones en genes de la denominada *ruta autónoma* provocan una fuerte respuesta a la vernalización, de modo que el retraso en la floración de los mutantes en dichos genes se corrige cuando las plantas se someten a tratamiento de frío. Para saber si la función de los genes *VOZ* podrían estar relacionada con la ruta autónoma estudiamos el efecto de la vernalización sobre la floración del doble mutante *voz1 voz2*.

Para ver cómo la vernalización afecta al fenotipo del doble mutante *voz1 voz2*, se analizó la floración de plantas provenientes de semillas que, tras ser sembradas en suelo, se sometieron a un tratamiento de frío de 4 semanas en oscuridad. Como control en estos análisis, incluimos un mutante en el gen *FVE*, de la *ruta autónoma*, que muestra un retraso en la floración que se corrige por el tratamiento de vernalización (Ausín *et al.*, 2004). Se determinó el tiempo de floración, medido como el número total de hojas producidas por el tallo principal, de plantas de Col-0 silvestre, *fve* y el doble *voz1 voz2*, sometidas o no al tratamiento de vernalización.

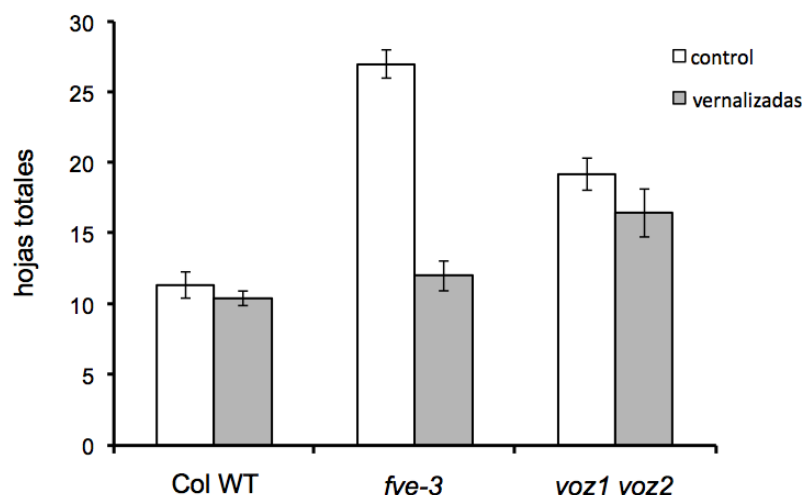


Figura 2.19. Efecto de la vernalización sobre el fenotipo de floración del doble mutante *voz1 voz2*. Número de hojas producidas por el tallo principal de plantas de Col-0 silvestre, el mutante *fve-3* y el doble *voz1-1 voz2-1*, cultivados en condiciones de día largo y provenientes de semillas sometidas (barras grises) o no (barras blancas) a un tratamiento de vernalización. Los datos representan la media \pm desviación estándar.

Se observó que la vernalización causó una cierta reducción del tiempo de floración en el doble mutante *voz1 voz2*. No obstante, el grado de reducción que causó la vernalización fue relativamente pequeño (las plantas vernalizadas produjeron un 85% de las hojas producidas por las no tratadas), similar al nivel de reducción que causó en las plantas silvestres (que florecieron con un 91% de las hojas producidas por las no tratadas; Fig. 2.19 y Tabla 2.3). Sin embargo, en las plantas del mutante *fve-3* la vernalización causó una reducción del tiempo de floración mucho mayor (las plantas vernalizadas produjeron un 44% de las hojas producidas por las no tratadas), de manera que las plantas vernalizadas florecieron casi al mismo tiempo que las plantas del genotipo silvestre (Fig. 2.19 y Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Efecto de la vernalización sobre el tiempo de floración del doble mutante *voz1 voz2*.

Genotipo	Tratamiento	Hojas roseta ^{a, b}	Hojas caulinares ^{a, c}	Hojas totales ^{a, d}
silvestre (Col-0) ^e	- ^e	8.5 ± 1.0	3.0 ± 0.5	11.3 ± 1.0
silvestre (Col-0),	vernalizadas ^f	7.7 ± 0.4	2.6 ± 0.5	10.3 ± 0.5
<i>fve-3</i>	- ^e	23.1 ± 0.6	4.0 ± 0.6	27.1 ± 1.0
<i>fve-3</i>	vernalizadas ^f	9.6 ± 1.2	2.4 ± 0.5	12.0 ± 1.0
<i>voz1-1 voz2-1</i> ^e	- ^e	16.0 ± 1.6	3.2 ± 0.8	19.2 ± 1.1
<i>voz1-1 voz2-1</i> ^e	vernalizadas ^f	12.6 ± 1.6	3.8 ± 0.4	16.4 ± 1.6

a, Cada valor representa la media ± desviación estándar. Para todos los genotipos se analizaron al menos 16 plantas cultivadas en condiciones estándar de día largo. **b**, Número de hojas de roseta. **c**, número de hojas caulinares del tallo principal. **d**, número total de hojas (roseta + caulinares) producidas por el tallo principal. **e**, Plantas derivadas de semillas que no se sometieron a ningún tratamiento. **f**, Plantas derivadas de semillas que, sembradas en suelo, se incubaron durante 4 semanas a 4°C en oscuridad.

Estos resultados indican que la vernalización no corrige el fenotipo de retraso en la floración del doble mutante *voz1 voz2* y sugieren que el efecto de los genes *VOZ* en la inducción de la floración no ocurre a través de la *ruta autónoma*.

2.5.5. Efecto de las giberelinas sobre la floración de los mutantes *voz*.

Las giberelinas son necesarias para la floración, especialmente bajo condiciones de día corto, cuando otras rutas promotoras de la floración no están activas. No obstante, también tienen un efecto promotor de la floración, aunque menos acusado, en condiciones de día largo, y así, por ejemplo, el triple mutante en los genes *GID1*, de los receptores de giberelinas, muestra retraso de la floración en día largo (Griffiths *et al.*, 2006; Willige *et al.*, 2007). Para analizar si la síntesis o la señalización de giberelinas podrían estar afectadas en los mutantes *voz*, se trató el doble mutante *voz1 voz2* con la hormona GA₃.

Para estudiar el efecto de las giberelinas sobre la floración del doble mutante *voz1 voz2*, se determinó el tiempo de floración, medido como el número total de hojas

producidas por el tallo principal, de plantas del doble mutante y del parental silvestre Col-0, cultivadas en condiciones de día largo, sometidas o no a un tratamiento con la hormona GA₃. La efectividad del tratamiento con GA₃ en estos experimentos se confirmó tratando, en paralelo, a plantas del mutante *gal-3*, que muestran un fenotipo enano debido una deficiencia severa en la síntesis de giberelinas (Sun *et al.*, 1992). La aplicación de GA₃ corrigió el fenotipo de las plantas mutantes *gal-3*, lo que demostró que el tratamiento fue efectivo.

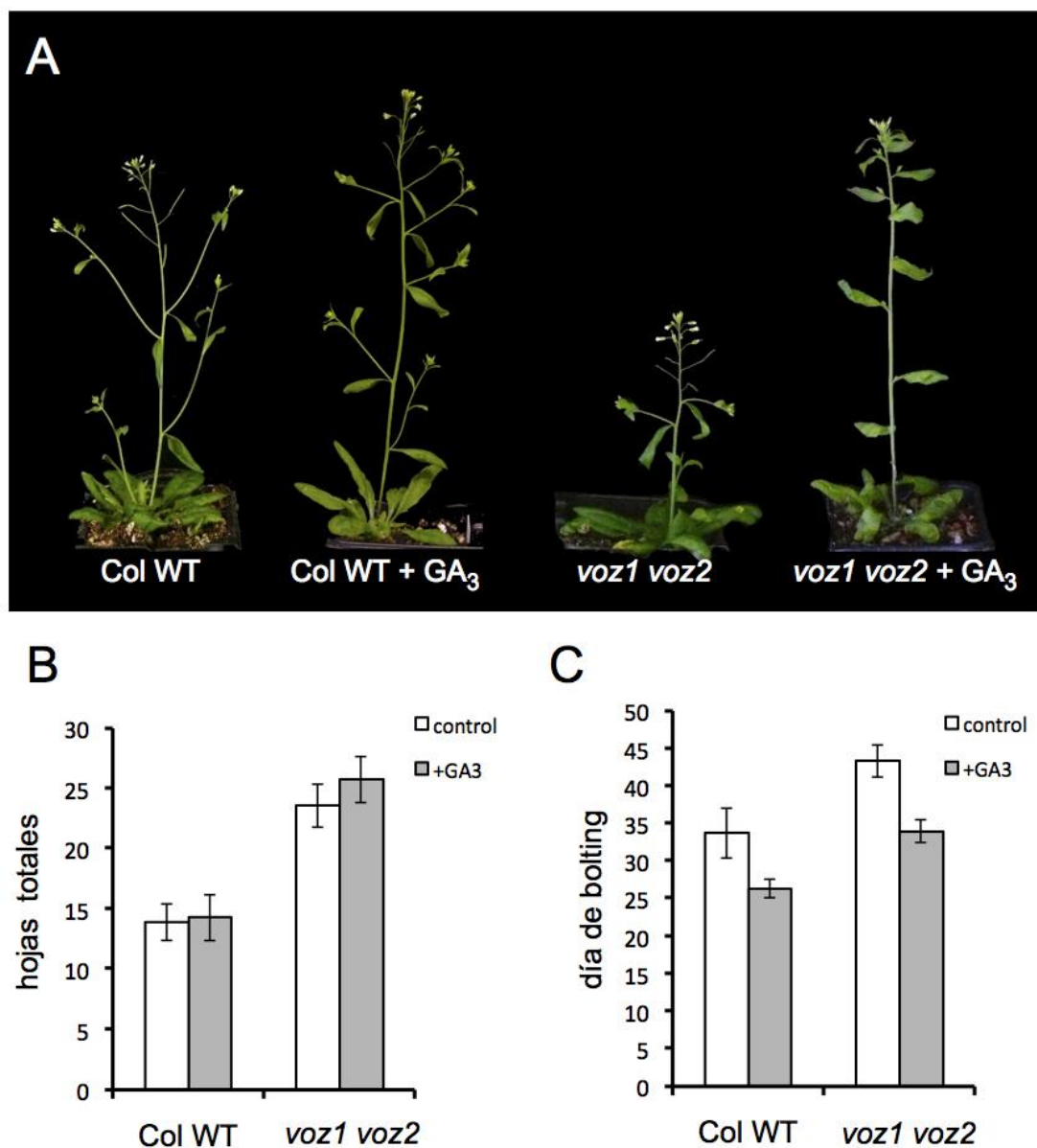


Figura 2.20. Efecto de las giberelinas sobre el fenotipo de floración del doble mutante *voz1* y *voz2*. (A) Plantas de la línea silvestre (Col-0) y del doble mutante *voz1-1 voz2-1* sometidas o no a tratamiento con GA₃. Las plantas se pulverizaron cada 3 días con una solución 100 μ M de GA₃. Se observa que las plantas tratadas con giberelinas produjeron un mayor número de hojas caulinares. (B) Número de hojas totales producidas por el tallo principal por plantas del parental silvestre y del doble mutante, sometidas o no a tratamiento con GA₃. (C) Número de días desde la germinación hasta el bolting de plantas del parental silvestre y del doble mutante, sometidas o no a tratamiento con GA₃. Los datos representan la media \pm desviación estándar.

En ambos genotipos se observó que el tratamiento con giberelinas produjo una reducción en el número de hojas de roseta, siendo esta reducción más notable en el caso del doble mutante *voz1 voz2* que en el parental silvestre (Tabla 2.4). Sin embargo, en ningún caso esto se tradujo en una reducción en el número total de hojas producidas por el tallo principal, que, de hecho, en ambos genotipos aumentó ligeramente, debido a un aumento en el número de hojas caulinares (Fig. 2.20 y Tabla 2.4). El aumento del número de hojas caulinares fue muy notable en el caso del doble mutante *voz1 voz2*, donde pasó de una media de 3.5 a 13 (Fig. 2.20A y Tabla 2.4). Es decir, ni en el parental silvestre ni en el doble mutante *voz1 voz2* el tratamiento con giberelinas adelantó la floración (entendida como la producción de la primera flor por el tallo principal) sino que causó un adelanto en el *bolting*, efecto que fue mucho más acusado en el doble mutante *voz1 voz2* (Fig. 2.20 y Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Efecto de las giberelinas sobre el tiempo de floración del doble mutante *voz1 voz2*.

Genotipo	Tratamiento	Hojas roseta ^{a, b}	Hojas caulinares ^{a, c}	Hojas totales ^{a, d}	Días de bolting ^a
silvestre (Col-0)	- ^e	11.1 ± 1.1	2.8 ± 0.6	13.1 ± 1.5	33.7 ± 3.3
silvestre (Col-0)	+ GA ₃ ^f	9.1 ± 0.9	5.1 ± 1.3	14.3 ± 1.9	26.4 ± 2.1
<i>voz1-1 voz2-1</i>	- ^e	20.1 ± 1.9	3.5 ± 0.9	23.6 ± 1.8	43.3 ± 1.2
<i>voz1-1 voz2-1</i>	+ GA ₃ ^f	12.7 ± 1.5	13.0 ± 0.7	25.7 ± 1.9	34.0 ± 1.5

a, Cada valor representa la media ± desviación estándar. Para todos los genotipos se analizaron al menos 10 plantas, cultivadas en condiciones estándar de día largo. **b**, Número de hojas de roseta. **c**, número de hojas caulinares del tallo principal. **d**, número total de hojas (roseta + caulinares) producidas por el tallo principal. **e**, Plantas que no se sometieron a ningún tratamiento. **f**, Plantas que se pulverizaron cada 3 días con una solución 100 µM de GA₃.

Los resultados muestran, por tanto, que el tratamiento con giberelinas no corrige el fenotipo de retraso en la floración del doble mutante *voz1 voz2*, aunque adelantan muy significativamente el *bolting*. Esto sugiere que los genes *VOZ* podrían estar relacionados con la percepción de la señal de giberelinas en el proceso de floración, en el *bolting*.

2.6. Sobreexpresión de *VOZ1*.

2.6.1. Generación de líneas transgénicas con sobreexpresión de *VOZ1*.

Una herramienta útil para elucidar la función de un gen consiste en el análisis del fenotipo causado por su expresión constitutiva. Por ello decidimos generar plantas transgénicas de *Arabidopsis* con sobreexpresión del gen *VOZ1*.

Para producir líneas de sobreexpresión de *VOZ1* generamos la construcción 35S::*VOZ1*, en la que la expresión de la región codificante del cDNA del gen *VOZ1* se halla dirigida por dos copias en tándem del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Fig. 2.21). Esta construcción se transformó tanto en plantas del ecotipo Col-0 como de *Ler*; de este último, se transformó la línea delatora *LerPBG6*, que contiene una construcción TFL1pro::*GUS* (Serrano-Mislata, 2010).

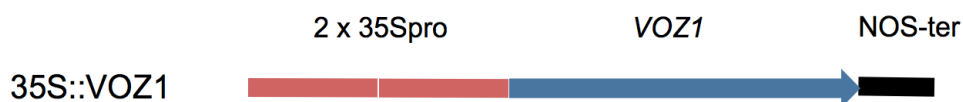


Figura 2.21. Esquema de la construcción utilizada para generar plantas transgénicas de *Arabidopsis* con sobreexpresión del gen *VOZ1*. En la construcción 35S::*VOZ1* la secuencia codificante del cDNA del gen *VOZ1* se subclonó tras dos copias en tándem del promotor 35S. Se representa el promotor 2x35S (en rojo), la secuencia codificante de *VOZ1* (en azul) y el terminador del gen *NOS* (en negro).

En el escrutinio preliminar de las poblaciones T1 se detectó la presencia de plantas que aparentemente presentaban cierto adelanto en la floración y que tenían alguna flor axilar. Tras el análisis de segregación del transgén en las correspondientes plantas T2, seleccionamos para cada ecotipo dos líneas representativas en las que el transgén se había insertado en un único locus, y seleccionamos para cada una de ellas plantas homocigotas para el transgén, generando así las líneas #4.3 y #16.19, para el fondo Col-0, y las líneas #17.5 y #18.18, para el fondo *Ler*.

Para analizar si, en efecto, las líneas seleccionadas mostraban sobreexpresión del gen *VOZ1* se compararon los niveles de expresión de *VOZ1* de plantas de las diferentes líneas transgénicas con el nivel en plantas de sus correspondientes parentales silvestres; el análisis se llevó a cabo mediante RT- qPCR (Fig. 2.22).

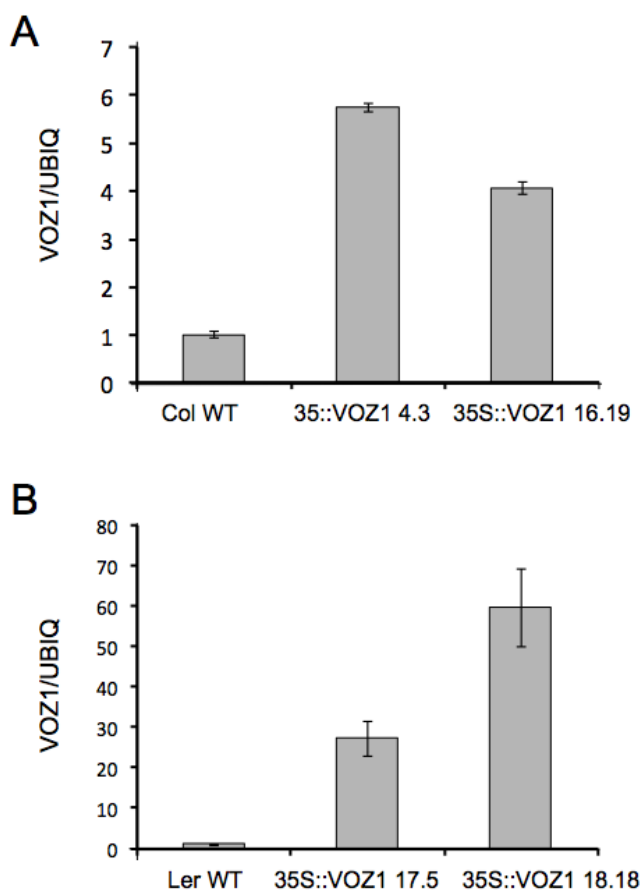


Figura 2.22. Nivel de expresión de *VOZ1* en las líneas 35S::*VOZ1*. (A) Líneas transgénicas 35S::*VOZ1* #4.3 y #16.19, del ecotipo Col-0. (B) Líneas transgénicas 35S::*VOZ1* #17.5 y #18.18, del ecotipo Ler. Los niveles relativos de expresión de *VOZ1* se determinaron en plántulas de dos semanas mediante RT-qPCR, utilizando *UBQ1* como gen constitutivo de referencia. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar.

El análisis de los niveles de expresión de *VOZ1* mostró que las cuatro líneas transgénicas expresaban altos niveles de *VOZ1* respecto a las correspondientes líneas parentales silvestres Col-0 y *Ler*, lo que indica que, en efecto, las distintas líneas 35S::*VOZ1* sobreexpresan el transgén.

2.6.2. Fenotipo de floración de las líneas 35S::*VOZ1*.

Una vez aisladas las líneas homocigóticas 35S::*VOZ1*, se procedió a analizar con más detalle el fenotipo de las mismas. Comparamos el tiempo de floración de las líneas transgénicas con el de sus correspondientes parentales tanto en condiciones de día largo como de día corto.

Las plantas de las cuatro líneas 35S::*VOZ1* presentaron un adelanto en el tiempo de floración respecto a sus correspondientes líneas parentales silvestres, tanto cuando se

cultivaron en condiciones de día largo como en condiciones de día corto (Fig. 2.23 y Tablas 2.5 y 2.6).

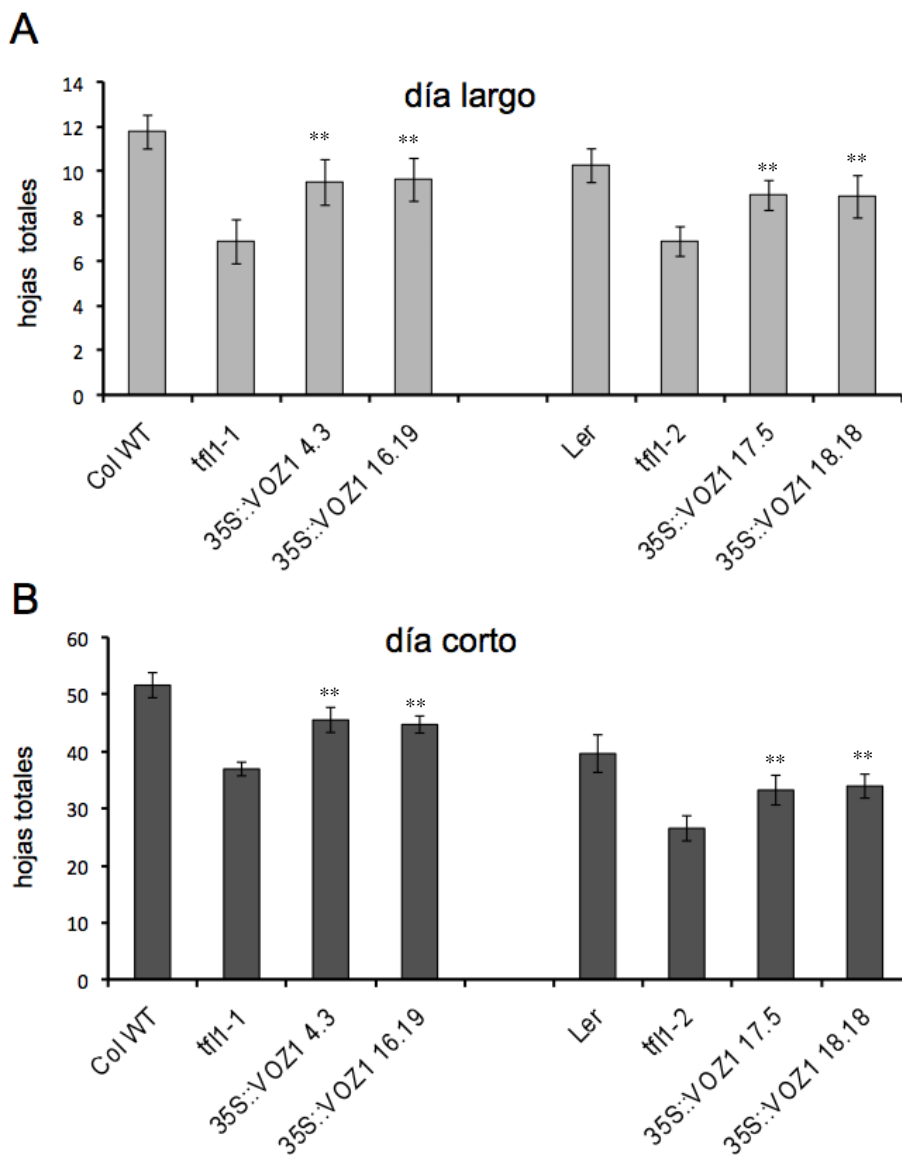


Figura 2.23. Fenotipo de floración de las líneas de sobreexpresión de *VOZ1*. (A) Número de hojas del tallo principal de las líneas de sobreexpresión de *VOZ1* en el ecotipo Col-0, 35S::*VOZ1* #4.3 y 35S::*VOZ1* #16.19, y en el ecotipo Ler, 35S::*VOZ1* #17.5 y 35S::*VOZ1* #18.18, cultivadas en condiciones de día largo. (B) Número de hojas del tallo principal de las líneas de sobreexpresión de *VOZ1* en el ecotipo Col-0 y en el ecotipo Ler, cultivadas en condiciones de día corto. Se analizaron 16 plantas por genotipo. Los datos representan la media ± desviación estándar. ** $P < 0.001$.

En las líneas de sobreexpresión cultivadas en condiciones de día largo se observó además otro fenotipo adicional, consistente en que, en algunos casos, los meristemos axilares asociados a las hojas caulinares no se desarrollaban como coflorescencias, sino como flores (Fig. 2.24). Estas flores axilares, normalmente una por planta, sólo aparecían en, aproximadamente, la mitad de las plantas analizadas (Tabla 2.5). En algunos casos las

flores axilares se observaban en el tallo de la inflorescencia principal y en otros en las coflorescencias secundarias.



Figura 2.24. Fenotipo de flores axilares en plantas 35S::VOZ1. Plantas de 34 días de la línea 35S::VOZ1#17.5 y #18.18., cultivadas en condiciones de día largo, donde se observan flores axilares en el tallo principal.

Tabla 2.5. Fenotipo de floración en día largo de las líneas de sobreexpresión de VOZ1.

Genotipo	Hojas de roseta ^{a, b}	Hojas caulinares ^{a, c}	Hojas totales ^{a, d}	Días de bolting ^{a, e}	Flores axilares ^f
Silvestre (Col-0)	9.5 ± 0.6	2.3±0.5	11.8±0.7	18.5±0.5	0%
<i>tfl11-1</i>	5.5±0.7	1.3±0.7	6.8±1.0	14.6±0.7	100%
35S::VOZ1 4.3	7.2±0.8	2.4±0.5	9.6±1.0	16.7±0.6	50%
35S::VOZ1 16.19	7.1±0.9	2.5±0.5	9.6±0.9	16.7±1.1	40%
35S::YFP::VOZ1	7.1±1.0	2.1±0.4	9.3±1.4	16.8±0.8	40%
Silvestre (LerPBG6)^g	7.9±0.6	2.4±0.5	10.3±0.8	17.1±0.8	0%
<i>tfl11-2</i>	5.3±0.5	1.5±0.6	6.8±0.7	14.0±0.5	100%
35S::VOZ1 17.5^g	6.8±0.6	2.1±0.3	8.9±0.7	15.6±0.7	60%
35S::VOZ1 18.18^g	6.6±0.9	2.2±0.5	8.8±1.0	15.4±1.0	45%

a, Cada valor representa la media ± desviación estándar. Para todos los genotipos se analizaron al menos 16 plantas cultivadas en condiciones estándar de día largo. **b,** Número de hojas de roseta. **c,** Número de hojas caulinares del tallo principal. **d,** Número total de hojas (roseta + caulinares) producidas por el tallo principal. **e,** Número de días desde germinación hasta que el tallo de inflorescencia elongó hasta un tamaño de ≈ 0.5 cm. **f,** Porcentaje de plantas que presentaron alguna flor axilar. **g,** El parental de las líneas #17.5 y #18.8 fué la línea LerPBG6, una línea del ecotipo *Ler* con una construcción delatora TFL1pro::GUS.

El adelanto en la floración y la formación de flores axilares observados en las líneas de sobreexpresión 35S::VOZ1 recuerdan al fenotipo causado por la pérdida de función de *TFL1*. Por esta razón, decidimos incluir mutantes *tfl1* en nuestros análisis (*tfl1-1* para el ecotipo Col y *tfl1-2* para el ecotipo Ler). Observamos que en los mutantes *tfl1* el adelanto en la floración es mayor que en las líneas de sobreexpresión de *VOZ1* (Fig. 3.23 y Tablas 3.5 y 3.6). Respecto a la presencia de flores axilares, mientras que en las líneas 35S::VOZ1 sólo aparecían en una fracción de las plantas y en un número reducido, éstas aparecían en todas las plantas *tfl1*, donde prácticamente todas las hojas caulinares sustentaban flores axilares en vez de coflorescencias (Tabla 3.5).

Tabla 2.6. Tiempo de floración en día corto de las líneas de sobreexpresión de *VOZ1*.

Genotipo	Hojas de roseta ^{a, b}	Hojas caulinares ^{a, c}	Hojas totales ^{a, d}
Silvestre (Col-0)	47.9 ± 1.9	3.7±0.6	51,6±2.2
<i>tfl1-1</i>	34.2±1.1	2.7±0.4	36.9±1.2
35S::VOZ1 4.3	42.0±2.3	3.5±0.5	45.5±2.2
35S::VOZ1 16.19	41.5±1.4	3.2±0.4	44.7±1.5
Silvestre (Ler PBG6)	36.2±3.3	3.4±0.7	39.6±3.3
<i>tfl1-2</i>	24.0±1.9	2.5±0.5	26.5±2.2
35S::VOZ1 17.5	30.7±2.8	2.5±0.8	33.2±2.6
35S::VOZ1 18.18	31.5±2.4	2.4±0.7	33.9±2.1

a, Cada valor representa la media ± desviación estándar. Para todos los genotipos se analizaron al menos 16 plantas cultivadas en condiciones de día corto. **b**, Número de hojas de roseta. **c**, Número de hojas caulinares del tallo principal. **d**, Número total de hojas (roseta + caulinares) producidas por el tallo principal. **e**, El parental de las líneas #17.5 y #18.8 fué la línea LerPBG6, una línea del ecotipo *Ler* con una construcción delatora *TFL1*pro::GUS.

En resumen, los resultados de nuestro análisis muestran que la sobreexpresión de *VOZ1* causa adelanto de la floración, tanto en día corto como en día largo, y la formación de flores axilares en día largo. La similitud de este fenotipo con el causado por la pérdida de función de *TFL1* sugiere la posibilidad de que *VOZ1* pueda actuar como un represor de la expresión de *TFL1*.

2.7. Efecto de VOZ1 en la expresión de *TFL1*.

2.7.1. Expresión de TFL1pro::GUS en plantas que sobreexpresan *VOZ1*.

El hecho de que la proteína VOZ1 interaccione de manera directa con el promotor de *TFL1*, así como el efecto en la floración y en la arquitectura de la inflorescencia (la formación de flores axilares) que causan las mutaciones en los genes *VOZ* y la sobreexpresión de *VOZ1*, sugieren que *VOZ1* tenga un papel en la regulación de la expresión de *TFL1*.

Para ver si los cambios en el nivel de *VOZ1* afectan al nivel o al patrón de expresión de *TFL1*, en una primera aproximación se utilizó *LerPBG6*, una línea delatora de *Arabidopsis* que contiene una construcción TFL1pro::GUS con el promotor completo de *TFL1* (Serrano-Mislata, 2010), para analizar cómo la sobreexpresión de *VOZ1* afecta a la expresión de TFL1pro::GUS.

Se comparó la expresión de TFL1pro::GUS en plantas homocigotas de la línea *LerPBG6* y de las líneas 35S::VOZ1 #17.5 y #18.18, derivadas de la transformación de *LerPBG6* con la construcción 35S::VOZ1 (ver apartado 2.6.1). Se analizó la expresión de TFL1pro::GUS, mediante la detección histoquímica de la actividad GUS, en ápices de plantas en diferentes edades de estas tres líneas.

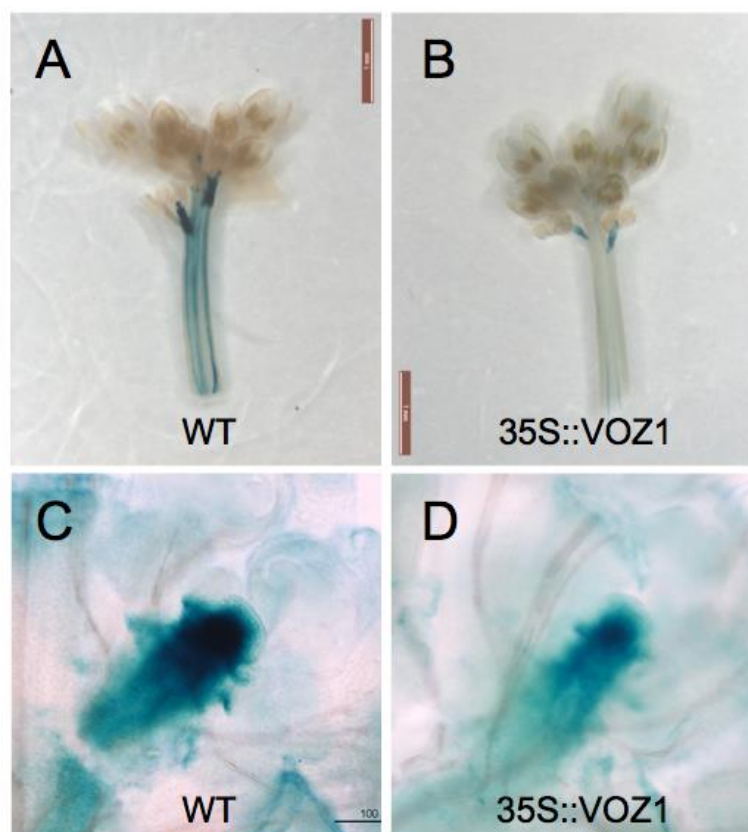


Figura 2.25. Efecto de la sobreexpresión de *VOZ1* en la expresión de *TFL1pro::GUS*. (A) Expresión de *TFL1pro::GUS* en el ápice de inflorescencia en bolting de plantas control LerPBG6 y de una planta 35S::*VOZ1* #17.5. (B) Detalle al microscopio de los meristemas de la inflorescencia principal de dichos ápices. Las muestras se incubaron con los reactivos de la tinción de GUS durante toda la noche y posteriormente se trataron con hidrato de cloral.

En general, no observamos diferencias significativas en la señal GUS entre las distintas líneas en los ápices de plantas antes del *bolting*. Sin embargo, en los ápices de plantas en las que estaba ocurriendo el *bolting* se observó una clara disminución de la expresión de *TFL1pro::GUS* en las plantas 35S::*VOZ1* con respecto al control, especialmente en el tallo de la inflorescencia, donde la señal desaparecía casi totalmente en las plantas que sobreexpresaban *VOZ1* (Fig. 2.25A, B). El análisis de la señal de GUS en el meristemo apical de esas inflorescencias también mostró cierta disminución de la señal de *TFL1pro::GUS* en las plantas 35S::*VOZ1*, aunque la diferencia con la expresión en el control fué menor que la observada en los tallos (Fig. 2.25C, D).

Estos resultados indican que la sobreexpresión de *VOZ1* causa una disminución del nivel *TFL1*, lo que sugiere que *VOZ1* actúa como un represor de su expresión, especialmente en la vasculatura del tallo de la inflorescencia.

2.7.2. Expresión de *TFL1* en fondos de pérdida o ganancia de función de *VOZ1*.

Los resultados del apartado anterior, con las líneas *TFL1pro::GUS*, indican que cambios en el nivel de *VOZ1* afectan a la expresión de *TFL1*. Para analizar si los resultados obtenidos con la construcción delatora *TFL1pro::GUS*, en efecto, reflejan lo que ocurre con el mRNA de *TFL1*, analizamos de qué manera cambios en el nivel de *VOZ1* afectan a la expresión del gen *TFL1* endógeno.

Se determinó mediante RT-qPCR la expresión de *TFL1* en el parental silvestre, en el doble mutante *voz1 voz2* y en plantas *35S::VOZ1*. Puesto que en el análisis con las líneas deladoras *TFL1pro::GUS* las diferencias más claras se observaron al comparar ápices de inflorescencia en *bolting*, fue ése el material vegetal que se utilizó para determinar los niveles del mRNA de *TFL1*.

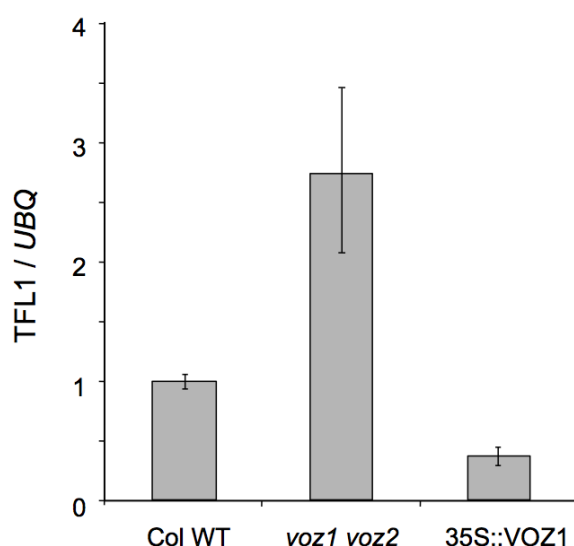


Figura 2.26. Efecto de cambios en *VOZ1* en el nivel de expresión de *TFL1*. Niveles de expresión de *TFL1* en ápices de inflorescencias en *bolting* de plantas de la línea silvestre (Col-0), del doble mutante *voz1 voz2* y de la línea *35S::VOZ1* 4.3 (en fondo Col-0), determinados mediante RT-qPCR. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error, la desviación estándar. Como gen constitutivo de referencia se utilizó la *UBIQ10*.

Los resultados de este análisis mostraron que la expresión de *TFL1* es más elevada en los ápices del doble mutante *voz1 voz2* que en los del parental silvestre y que en los ápices de las plantas *35S::VOZ1* es más baja (Fig. 2.26); este segundo dato concuerda con los resultados del análisis con las plantas *TFL1pro::GUS*.

Estos resultados indican que la ausencia de *VOZ1* causa un aumento en la expresión de *TFL1* y que la sobreexpresión de *VOZ1* causa una disminución de *TFL1*. Esto, de

nuevo, sugiere que VOZ1 participa en el control del nivel de *TFL1*, actuando como un represor de su expresión.

2.8. Caracterización preliminar de VOZ2.

El gen *VOZ2* es el segundo miembro de los genes *VOZ* presente en *Arabidopsis thaliana*. Codifica una proteína que comparte una identidad del 53% con VOZ1 y, como ésta, presenta un dominio conservado (dominio B o dominio-VOZ), con una región en la que está predicha la formación de un dedo de zinc y una región básica que representa un dominio NAC divergente (Mitsuda *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2005). Tal como ocurre para *VOZ1*, la función de *VOZ2* es desconocida.

Tal como se describe en el apartado 2.5 de resultados, el análisis de los mutantes *voz2* no mostró ningún fenotipo evidente, mientras que los dobles mutantes *voz1 voz2* muestran retraso en la floración, lo que indica que *VOZ2* funciona redundantemente con *VOZ1* promoviendo la floración. Por esta razón, y por el hecho de ser un homólogo del gen *VOZ1*, decidimos estudiar algunos aspectos de *VOZ2* que pudiesen proporcionarnos indicios sobre su función.

2.8.1. Expresión del gen VOZ2 en distintos tejidos de la planta.

El patrón de expresión de un gen puede proporcionar información acerca de su posible función. Con la finalidad de conocer el patrón de expresión del gen *VOZ2*, procedimos a determinar los niveles del mRNA de *VOZ2* en diferentes órganos de la planta, mediante RT-qPCR.

Nuestro análisis mostró que *VOZ2* se expresa en todos los tejidos analizados, observándose que los niveles de expresión de *VOZ2* son más altos en tallo, hoja caulinar y fruto joven (Fig. 2.27). Este patrón de expresión, en general coincide con el publicado en la base de datos “Bio- Array Resource” (BAR).

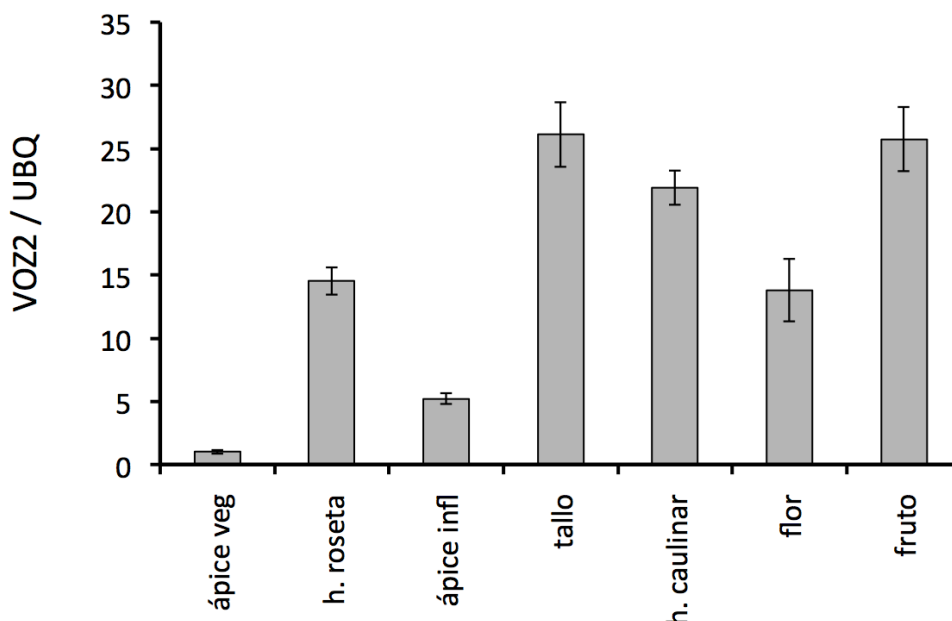


Figura 2.27. Expresión de VOZ2 en diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana*. Niveles de expresión de VOZ2 en diferentes tejidos de *Arabidopsis* (Col-0), determinados mediante RT-qPCR. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error, la desviación estándar entre ellas. Como gen constitutivo de referencia se utilizó la *UBI10*. ápice veg, ápice vegetativo; ápice infl, ápice de inflorescencia; h. roseta, hoja de roseta; h. caulinar, hoja caulinar.

Nuestros resultados indican que la distribución de la expresión de los genes *VOZ1* y *VOZ2* en los distintos tejidos de la planta es bastante similar, lo que concuerda con la idea de que ambos genes puedan tener funciones similares.

2.8.2. Análisis de la localización subcelular de la proteína VOZ2.

Para estudiar la localización subcelular de la proteína VOZ2, se generó la construcción 35S::YFP-VOZ2, en la que la región codificante (CDS) del cDNA del gen VOZ2 (desde el ATG al codón de parada) se fusionó al extremo C-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP), bajo el control del promotor constitutivo 35S (Fig. 2.28).

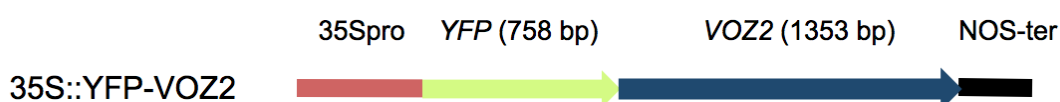


Figura 2.28. Esquema de la construcción utilizada para estudiar el patrón de localización subcelular de la proteína VOZ2. En la construcción 35S::YFP-VOZ1 se fusionó la región codificante del cDNA del gen VOZ2 al extremo C-terminal de la proteína YFP y en la construcción 35S::VOZ1-YFP la región codificante de VOZ1 se fusionó al extremo N-terminal de la proteína YFP. Se representa el promotor 35S (en rojo), el gen YFP (en amarillo), el gen GFP (en verde), la CDS del gen VOZ1 (en azul) y el terminador del gen NOS (en negro); se indica el tamaño relativo de los genes.

La construcción 35S::YFP-VOZ2 se utilizó para agroinfiltrar hojas de *Nicotiana bentamiana*, para conseguir la expresión transitoria del transgén *YFP-VOZ2*. En la Figura 2.29 se muestra el patrón de localización subcelular de la proteína YFP-VOZ1; la fluorescencia de la proteína de fusión YFP-VOZ2 se detectó exclusivamente en el citoplasma.

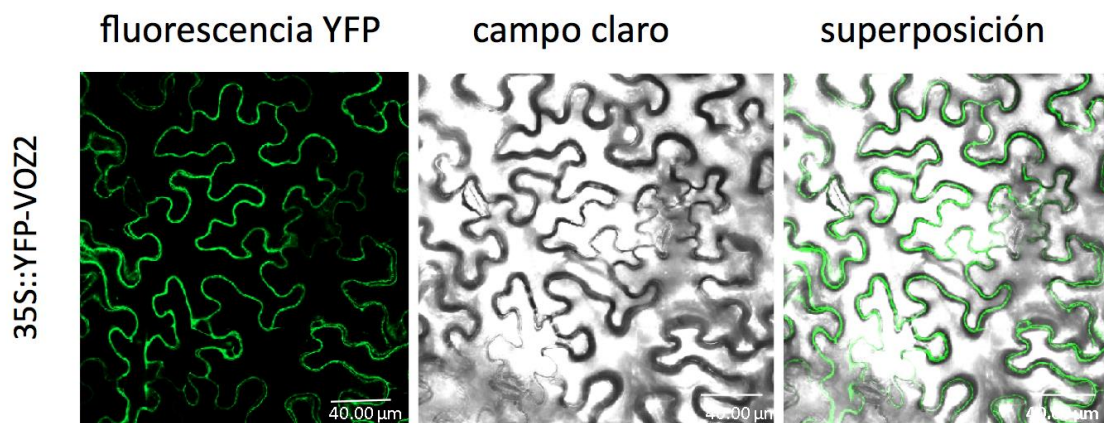


Figura 2.29. Localización subcelular de la proteína VOZ2 en *Nicotiana bentamiana*. Se muestran imágenes de microscopía confocal de la epidermis de hojas de *N. bentamiana* que se infiltraron con la construcción 35S::YFP-VOZ2.

Estos resultados indican que la proteína VOZ2 se localiza en el citoplasma. En este sentido, las proteínas VOZ1 y VOZ2 se comportan de distinta manera, ya que la proteína VOZ1 se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo (apartado 2.3.3).

2.8.3. Interacción de VOZ2 con el promotor de *TFL1* en el ensayo de activación de la luciferasa.

Puesto que VOZ2 actúa de manera redundante con VOZ1, promoviendo la floración, cabe pensar que la proteína VOZ2 pueda funcionar, al igual que VOZ1, como regulador de la expresión de *TFL1*. Por ello, nos preguntamos si VOZ2 es capaz de unirse *in vivo* al promotor de *TFL1*.

Para contestar esa pregunta, se analizó la capacidad de VOZ2 de activar la expresión del promotor de *TFL1* en el ensayo de activación transitoria de la luciferasa (Hellens *et al.*, 2005). Del mismo modo que para los ensayos con la proteína VOZ1, se generó una construcción 35S::VOZ2-VP16 (Fig. 2.30) con la que se ensayó si la expresión transitoria de la proteína VOZ2-VP16 activaba la expresión del gen *LUC* bajo el control del promotor de *TFL1* en la construcción TFL1pro::LUC (Fig. 3.11), la misma que se

empleó para analizar la activación por VOZ1 del promotor de *TFL1* (apartado 2.4.1 de Resultados). Así mismo, también se utilizó como control positivo de activación del promotor de *TFL1* la proteína LFY-VP16 y, como controles negativos, el plásmido vacío pGII0800-LUC y la construcción TFL1pro:LUC.

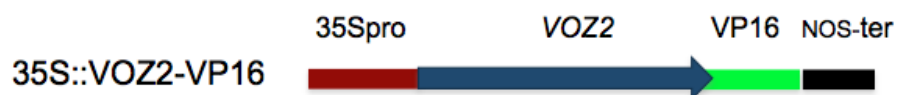


Figura 2.30. Esquema de la construcción utilizada en los ensayos de activación de la luciferasa por VOZ2. En la construcción 35S::VOZ2-VP16 el dominio activador VP16 se fusionó al extremo C-terminal de la región codificante del cDNA de VOZ2. Se representa el promotor 35S (en rojo), la CDS del gen *VOZ1* (en azul), el dominio VP16 (en verde) y el terminador del gen *NOS* (en negro).

Los experimentos mostraron que tanto las hojas infiltradas con 35S::VOZ2-VP16 como las infiltradas con 35S::LFY-VP16 presentaron niveles de actividad luciferasa considerablemente superiores a las infiltradas sólo con la construcción TFL1pro:LUC o con el vector vacío (Fig. 2.31).

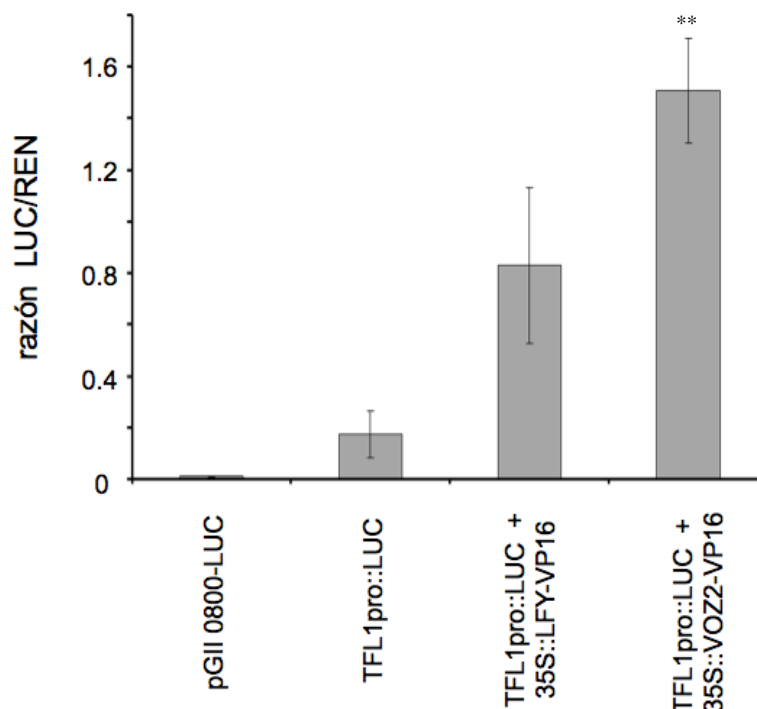


Figura 2.31. Activación transitoria del promotor de *TFL1* por la proteína VOZ2. Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana bentamiana* con las combinaciones de plásmidos indicadas en la gráfica. Transcurridos tres días, se cuantificó en un luminómetro la señal emitida por la proteína LUC y por la RENILLA (control interno) y se representó el ratio LUC/REN. Como controles negativos se utilizaron hojas infiltradas con el vector vacío o sólo con la construcción TFL1pro:LUC. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. ** $P < 0.001$.

Nuestros resultados indican que la proteína VOZ2 es capaz de unirse, en un sistema *in vivo*, al promotor de *TFL1*. Esto sugiere que la redundancia funcional de *VOZ1* y *VOZ2* podría deberse a que ambos factores puedan regular de manera similar a *TFL1* y, quizás, a un mismo grupo de reguladores de la floración.

2.9. Interacción genética entre los genes *VOZ* y *TFL1*.

Los resultados presentados hasta ahora indican que *VOZ1* actúa regulando la expresión de *TFL1*, posiblemente como un represor. Puesto que *TFL1* es un represor de la floración, el efecto en la floración que se observa en los mutantes en los genes *VOZ* podría deberse únicamente a los cambios en la expresión de *TFL1*, causados por las alteraciones en *VOZ*. Alternativamente, puede que el efecto de los *VOZ* sobre floración no tenga lugar sólo a través de *TFL1* sino que los factores *VOZ* podrían controlar la expresión o actividad de otros reguladores de la floración. Para contestar a esta pregunta se abordó el análisis de la interacción genética entre los genes *VOZ* y *TFL1* en combinaciones de pérdida de función y de ganancia de función.

2.9.1. Combinación de pérdida de función de los genes *VOZ* y *TFL1*.

Para entender interacción genética entre *TFL1* y los genes *VOZ* se procedió combinar en un mismo genotipo la mutación *tfl1* con mutaciones en los dos genes *VOZ*. Puesto que los genes *VOZ* aparentemente actúan de manera redundante, y el fenotipo en floración sólo se observa en el doble mutante *voz1 voz2*, se decidió generar un triple mutante *voz1 voz2 tfl1* en el que analizar la interacción entre dichos genes.

Para generar el triple mutante, se realizaron cruces entre una planta doble mutante *voz1-1 voz2-1* y una planta mutante *tfl1-1* y en las poblaciones F2 resultantes se buscaron plantas que fuesen homocigotas para las tres mutaciones.

En la población F2 aparecieron plantas homocigotas *tfl1-1* en una proporción que concuerda con una segregación mendeliana (49 plantas con fenotipo *tfl1-1* de 200 plantas analizadas). Sin embargo, las mutaciones *voz1-1* y *voz2-1*, cuya segregación se determinó mediante genotipado de las plantas F2, aparecieron en la población F2 en una proporción muy inferior a la esperable para una segregación mendeliana (Tabla 3.7).

Tabla 2.7. Segregación de los distintos genotipos en la población F2 descendiente del cruce *voz1-1 voz2-1* x *tfl1-1*.

Alelo mutante	Homozigotos mutantes	Heterozigotos	Homozigotos silvestres	Total
<i>voz1-1</i>	4	111	85	200
<i>voz2-1</i>	0	26	174	200
<i>tfl1-1</i>	49	n.d.	n.d.	200

Esta segregación anómala de las mutaciones *voz1-1* y *voz2-1* ha impedido, hasta el momento, la identificación de un triple mutante *voz1-1 voz2-1 tfl1-1*.

2.9.2. Combinación de ganancia de función de los genes *VOZ* y *TFL1*.

Para superar el problema de no disponer de plantas triples mutantes *voz1 voz2 tfl1*, en las que analizar la interacción entre los genes *VOZ* y *TFL1*, se decidió estudiar esa interacción genética analizando el fenotipo resultante de combinar en un mismo fondo la sobreexpresión de los genes *VOZ1* y *TFL1*.

Para ello, se cruzaron plantas de una línea homocigota 35::TFL1 con plantas de una línea homocigota 35S::VOZ1, generando así semillas F1 hemizigotas para ambos transgenes. Como control en el experimento, se realizaron cruces entre las líneas homocigotas 35::TFL1 y 35S::VOZ1 con plantas del parental silvestre (Col-0), generando así semillas F1 hemizigotas para cada uno de los transgenes por separado. El análisis fenotípico de las líneas resultantes consistió en la determinación del tiempo de floración, medido como el número de hojas producidas por el tallo principal, de las correspondientes plantas F1 y del parental silvestre.

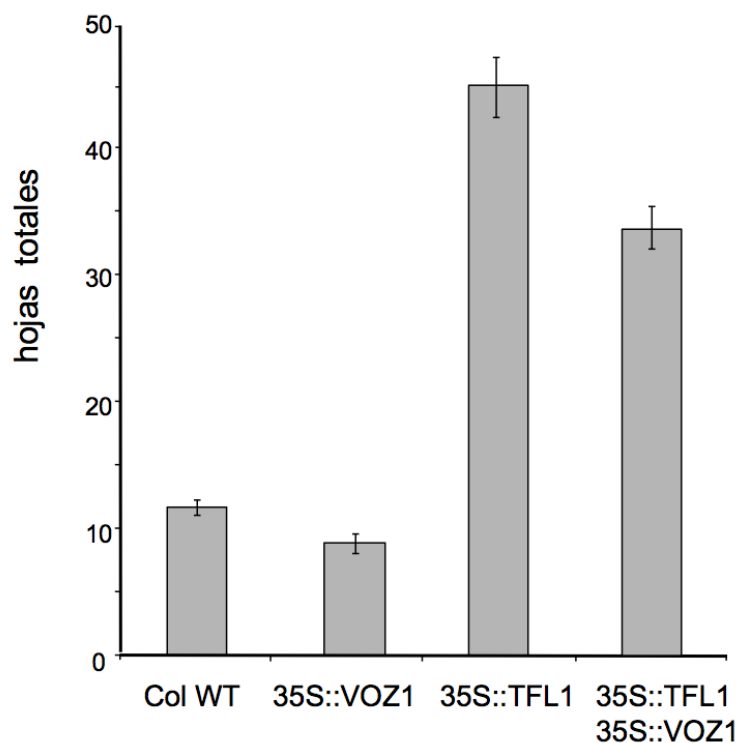


Figura 2.31. Fenotipo de floración causado por la sobreexpresión simultánea de *VOZ1* y *TFL1*. Número de hojas producidas por el tallo principal de plantas Col-0 silvestre, 35S::VOZ1 hemizigotas, 35S::TFL1 hemizigotas y plantas F1 del cruce de homocigotas 35S::TFL1 y 35S::VOZ1. Los datos representan la media \pm desviación estándar.

De acuerdo con lo ya descrito, las plantas de la línea 35S::VOZ1 mostraron una floración adelantada respecto al parental silvestre y las plantas 35S::TFL1 mostraron una floración muy tardía, produciendo muchas más hojas que el silvestre (Fig. 2.31). Las plantas de la línea 35S::VOZ1 35S::TFL1 mostraron un tiempo de floración intermedio entre las plantas 35S::TFL1 y el parental silvestre (Fig. 2.31); es decir, la presencia del transgén 35S::VOZ1 causó una reducción en el tiempo de floración de las plantas 35S::TFL1.

Si toda la actividad de VOZ1 como promotor la floración tuviese lugar a través de su función como regulador de la expresión de *TFL1*, la sobreexpresión de *TFL1* debería ser epistática a 35S::VOZ1. Nuestros resultados muestran que 35S::TFL1 no es epistático sobre 35S::VOZ1 y, por tanto, sugieren que VOZ1, además de controlando a *TFL1*, también actúa sobre la floración a través de otros reguladores distintos a *TFL1*.

2.10. Efecto de los factores VOZ sobre la expresión de genes reguladores de la floración.

Los resultados del análisis de interacción genética entre *VOZI* y *TFL1* sugiere que los genes VOZ podría participar en el control de la floración actuando sobre otros reguladores de ésta además de sobre *TFL1*. Por esta razón se decidió estudiar el posible efecto de los factores VOZ sobre la expresión de reguladores de la floración distintos a *TFL1*.

Para analizar el efecto de los genes VOZ sobre la expresión de reguladores de la floración se determinó, mediante RT-qPCR, el nivel de expresión de diversos genes reguladores de la floración en plántulas del doble mutante *voz1 voz2*, de una línea de sobreexpresión de *VOZI* y del genotipo silvestre. En estos experimentos se utilizó RNA extraído de plántulas cultivadas en día largo durante 10 días tras la germinación.

Hay que señalar que este tipo de experimento se repitió en varias ocasiones y encontramos una gran variabilidad en los niveles expresión para un mismo gen entre un experimento y otro. Esto sugiere que la actividad de los genes VOZ podría ser muy dependiente de condiciones ambientales y/o factores que no conocemos, que estarían influyendo en el comportamiento en los distintos experimentos de las líneas analizadas.

A pesar de ello, se presentan los resultados de un experimento concreto que refleja de modo aproximado las tendencias generales observadas en las distintas repeticiones en los cambios en la expresión de algunos de los reguladores de floración estudiados.

Como se observa en la Figura 2.32, la expresión de algunos de los reguladores analizados, aparentemente, mostraron cambios acordes a los niveles de los genes VOZ. Así, la expresión de los promotores de la floración *FT* y *LFY* fue baja en el doble mutante *voz1 voz2*, que florece tarde, y alta en las plantas que sobreexpresan *VOZI*, que florecen temprano. En concordancia con esto, la expresión del represor de la floración *FLC* fue alta en el doble mutante *voz1 voz2* y baja en las plantas que sobreexpresan *VOZI*. Por otra parte, no parece haber correlación entre los niveles de VOZ y la expresión de otros reguladores que también se analizaron.

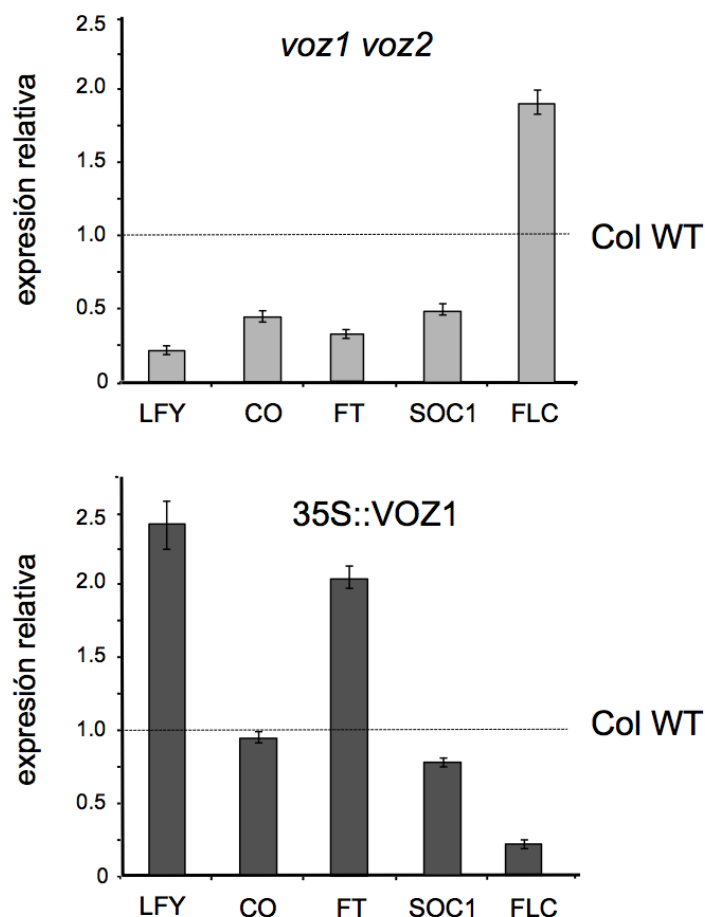


Figura 2.32. Efecto de la mutación de los genes *VOZ*, y de la sobreexpresión de *VOZ1*, en el nivel de expresión de diferentes reguladores de la floración. Niveles de expresión de diferentes genes de reguladores de floración en el doble mutante *voz1 voz2* y en *35S::VOZ1* (línea #4.3, en fondo Col-0). Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-qPCR sobre RNA extraído de plántulas de 10 días tras la germinación. El nivel de expresión para cada gen en cada genotipo se expresa en referencia al nivel de expresión para ese gen en el parental silvestre Col-0, al que se le asignó el valor de 1 (el nivel de Col-0 en cada gráfica se indica por una línea discontinua horizontal). Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error, a la desviación estándar entre ellas. Como gen constitutivo de referencia se utilizó el gen *TIR41*.

A pesar de la cautela con la que hay que tomar el resultado de estos experimentos, por lo que se ha comentado anteriormente, estos datos sugieren que los factores *VOZ* posiblemente controlan la expresión no sólo de *TFL1* sino también de otros reguladores de la floración.

2.11. Interacción de la proteína *VOZ1* con factores reguladores de la floración.

Los datos mostrados hasta ahora indican que *VOZ1* participa en el control de la floración no sólo regulando de manera directa de la expresión de *TFL1* sino que también interacciona con otros reguladores de la floración, controlando su expresión, puede que en algunos casos también de manera directa. Además de que *VOZ1* pueda controlar la

floración regulando la expresión de reguladores de la floración, otra posibilidad, no excluyente, es que module la actividad de algunos de estos reguladores interaccionando con ellos a nivel de proteína. De hecho, recientemente se ha descrito la interacción entre las proteínas homólogas de VOZ1 y FT de manzano (Mimida *et al.*, 2011). Esto sugiere la posibilidad de que, en *Arabidopsis*, la proteína VOZ1 interaccione con la proteína FT y, quizás también, con otras proteínas reguladoras de la floración.

Para contestar a la pregunta de si VOZ1 interacciona con la proteína FT y/o con otros factores reguladores de la floración analizamos la posible interacción de la proteína VOZ1 con diversas proteínas reguladoras de la floración en *Arabidopsis* mediante ensayos de complementación bi-molecular de fluorescencia (BiFC). Los ensayos de BiFC permiten visualizar *in vivo*, en células vegetales, la interacción entre dos proteínas y la localización donde ésta ocurre dentro de la célula.

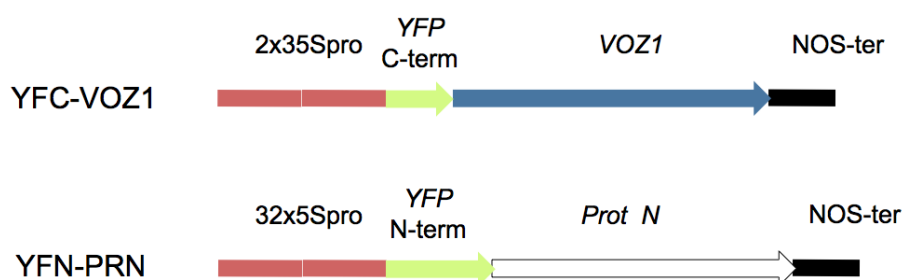


Figura 2.33. Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar la interacción de la proteína VOZ1 con proteínas reguladoras de la floración en ensayos de BiFC. En la construcción YFC-VOZ1 se fusionó la región codificante de VOZ1 al dominio C-terminal de la proteína YFP. En las construcciones de tipo YFN-PRN la región codificante de diferentes proteínas reguladoras de la floración se fusionaron al dominio N-terminal de la proteína YFP. Se representa el promotor 35S (en rojo), los dominios C-terminal y N-terminal de la YFP (en amarillo), las CDS del gen VOZ1 (en azul) y de las diferentes proteínas ensayadas (en blanco), y el terminador del gen NOS (en negro).

Para los ensayos de interacción con VOZ1 mediante BiFC, se generó la construcción YFC-VOZ1, en la que la región codificante de VOZ1 se clonó en el vector pYFC43 (Belda-Palazón *et al.*, 2012), fusionada a la mitad C-terminal de la proteína YFP, bajo el control de dos copias en tándem del promotor 35S (Fig 2.33). Por otra parte, para las proteínas a ensayar se generaron construcciones tipo YFN-PRN en las que las regiones codificantes de los correspondientes genes se clonaron en el vector pYFN43 (Belda-Palazón *et al.*, 2012), fusionadas a la mitad N-terminal de la proteína YFP, bajo el control de dos copias en tándem del promotor 35S (Fig 2.33). Se generaron construcciones tipo YFN-PRN para los reguladores de la floración FT, TFL1, CO, SOC1, AGL24, FLC y SVP.

Asimismo, también se generaron construcciones con VOZ2 y con TCP7, un factor de transcripción identificado como posible regulador de la expresión de *TFL1* (Fernández-Nohales, 2011). Para los ensayos de BiFC estas construcciones y sus combinaciones se agroinfiltraron en hojas de *Nicotiana bentamiana*, que tras tres días fueron observadas al microscopio confocal.

Como cabía esperar, en los ensayos control en que la infiltración se realizó con las construcciones individuales en ningún caso se observó fluorescencia (Fig 2.34). En los ensayos control, tampoco se observó fluorescencia cuando se agroinfiltró con la combinación de YFC-SOC1 con YFN-AKIM10, dos proteínas que no interaccionan, y sí se observó cuando se infiltró con la combinación de construcciones para las proteínas SOC1 y FUL, que interaccionan *in vivo* (Balanzá, 2011) (Fig 2.34).

En los experimentos con YFC-VOZ1 se observó fluorescencia cuando a la vez se infiltró con algunas de las construcciones YFN-PRN (Fig. 2.35). Así, se observó fluorescencia en el núcleo cuando se combinó YFC-VOZ1 con YFN-SOC1 o con YFN-TCP; con la combinación de YFC-VOZ1 con YFC-VOZ2 se observó fluorescencia en el citoplasma; y se observó fluorescencia en núcleo y citoplasma en las combinaciones de YFC-VOZ1 con YFN-FT, YFN-TFL1, YFN-FLC e YFN-SVP; por último, no se observó fluorescencia en las combinaciones con YFN-CO o con YFN-AGL24 (Fig. 2.35).

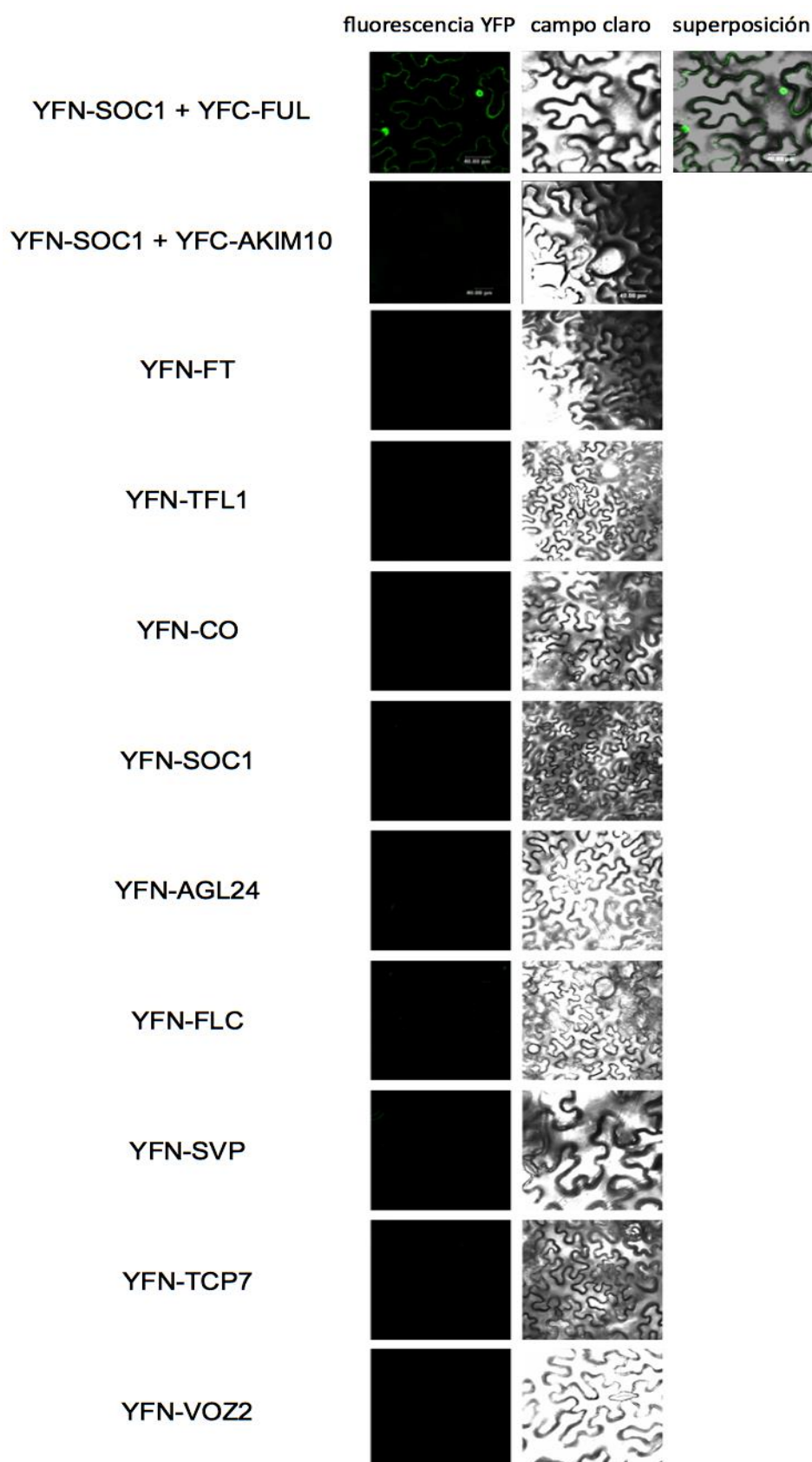


Figura 2.34. Controles de los ensayos de BiFC para analizar la interacción entre la VOZ1 y diferentes proteínas reguladoras de la floración. Fotografías al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana bentamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda de la figura.

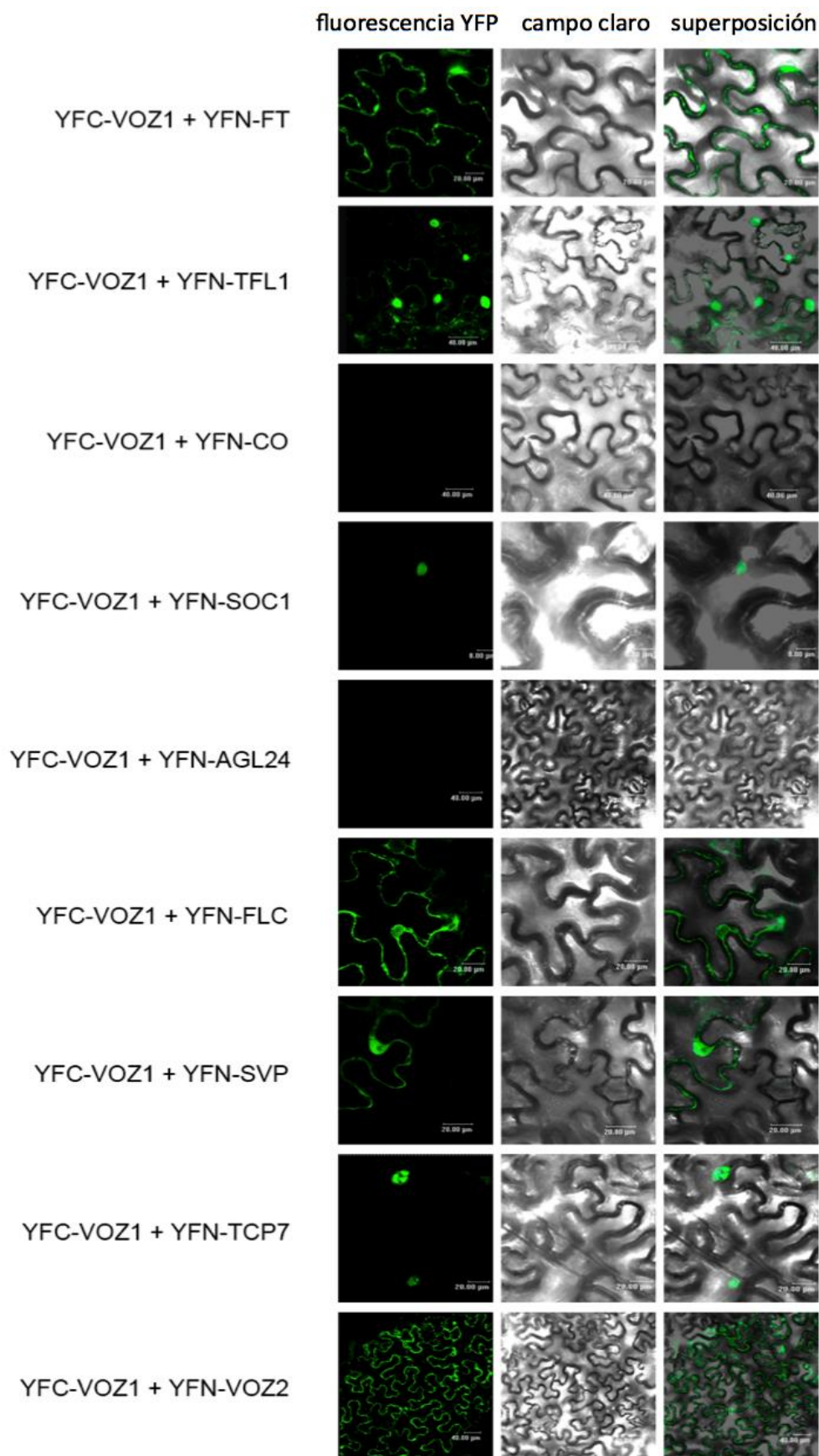


Figura 2.35. Estudio de interacción, mediante BiFC, entre la proteína VOZ1 y factores reguladores de la floración. Fotografías al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana bentamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda de la figura.

En resumen, estos resultados indican que la proteína VOZ1 es capaz de interaccionar a nivel de proteína con distintos reguladores de la floración, lo que sugiere que VOZ1 podría ejercer parte su función en el control de la floración modulando la actividad de esos reguladores. Por otra parte, la interacción que se observa entre VOZ1 y VOZ2 sugiere que ambas proteínas podrían actuar de manera conjunta en el control de la floración.

3-DISCUSIÓN

Por trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio, sabemos que la secuencia entre 2.8-3.2 de la región genómica 3' de *TFL1* se halla conservada entre distintas especies de brasicáceas y es esencial para el correcto patrón de expresión del gen, estando implicada en su expresión en el meristemo inflorescente y en la vasculatura de la inflorescencia (Serrano-Mislata, 2010; Fernández-Nohales, 2011). Dada la relevancia de este fragmento, se utilizó como cebo en un escrutinio de híbrido simple en levadura para buscar posibles reguladores de *TFL1*, que llevó a la identificación de *VOZ1*, cuya caracterización funcional ha constituido el objetivo de esta tesis.

Los resultados que se presentan muestran que *VOZ1* es un regulador directo de *TFL1* y que, de manera redundante con su homólogo *VOZ2*, controla el tiempo de floración en *Arabidopsis*. Además, resultados de análisis genético, así como de expresión y de interacción proteína-proteína, sugieren que *VOZ1* ejerce su función de control de la floración no sólo a través de su regulación directa de *TFL1*, sino que posiblemente también se hallen implicados otros reguladores clave de la floración.

3.1. *VOZ1* codifica un factor de transcripción de expresión en vasculatura.

Los genes *VOZ* codifican proteínas específicas de vegetales y en *Arabidopsis* constituyen una pequeña familia génica formada sólo por dos miembros, *VOZ1* y *VOZ2*. Es posible que las proteínas *VOZ* se hallen presentes en todas las plantas terrestres, ya que se han identificado homólogos a los genes *VOZ* en todas las angiospermas que se han analizado y en el musgo *Physcomitrella patens* (Mitsuda *et al.*, 2004). Tal como ocurre en *Arabidopsis*, en prácticamente todas las especies se han identificado dos genes *VOZ*.

Las proteínas *VOZ* fueron originalmente descritas como una nueva familia de factores de transcripción con dos dominios conservados que se denominaron dominio A y dominio B, donde el dominio B contiene un motivo de dedo de zinc y una región básica, necesaria para la unión al DNA y la dimerización (Mitsuda *et al.*, 2004). En un trabajo posterior se identificó a la región básica como un dominio NAC divergente (Olsen *et al.*, 2005).

Hasta recientemente, la función de las proteínas *VOZ1* y *VOZ2* era desconocida. No obstante, el alto nivel de similitud de sus secuencias y el parecido de sus patrones de expresión, hacía presumir que tuviesen funciones similares. Nuestros resultados muestran que los genes *VOZ* se expresan en todos los órganos de la planta de *Arabidopsis*, lo que

coincide con lo descrito por Mitsuda *et al.* (2004). Por otra parte, nuestros resultados, tanto de hibridación *in situ* como de fusión promotor-GUS, muestran que *VOZ1* se expresa en el meristemo de los ápices del tallo y en la vasculatura de todos los órganos, en el floema; esto último asimismo coincide con lo descrito por Mitsuda *et al.* (2004) y, recientemente, por Yasui *et al.* (2012), donde además también se muestra que *VOZ2*, aparte de en la vasculatura, también se expresa en toda la hoja. Es interesante señalar que la expresión de *VOZ1* solapa con la expresión de *TFL1*, en el floema del tallo de la inflorescencia y en el meristemo apical del tallo, lo que está de acuerdo con que *VOZ1* pueda ser un regulador de la expresión de *TFL1*.

Mitsuda *et al.* (2004) mostraron que las proteínas VOZ funcionan como factores de transcripción. Así, mostraron que tanto *VOZ1* como *VOZ2* son capaces de activar la transcripción de una construcción promotor-GUS en células en cultivo de *Arabidopsis*. Así mismo, mostraron que *VOZ2* es capaz de unirse a DNA, como dímero, a través del dominio B. De acuerdo con su función como factores de transcripción, nuestros resultados indican que la proteína *VOZ1* se localiza en el núcleo y en el citoplasma. Sin embargo, la proteína *VOZ2*, a pesar de que se ha demostrado que funciona en el núcleo, se acumula prácticamente sólo en el citoplasma, debido a que en el núcleo es muy inestable, estando sometida de manera continua a un proceso de degradación mediado por ubiquitinación (Yasui *et al.*, 2012). Estos datos sugieren que la actividad de las proteínas *VOZ1* y *VOZ2* podría no ser del todo equivalente.

3.2. *VOZ1* es un regulador directo de la expresión de *TFL1*.

Nuestros datos muestran que modificaciones en la expresión de *VOZ1* en *Arabidopsis*, bien por mutación de los genes *VOZ* o por la sobreexpresión de *VOZ1* en plantas transgénicas 35S::*VOZ1*, causan cambios en los niveles de expresión de *TFL1*. Así, en ápices en *bolting*, el nivel de expresión de *TFL1* es más alto en el doble mutante *voz1 voz2* que en el silvestre y es más bajo en las líneas de sobreexpresión 35S::*VOZ1*. Estos resultados sugieren que *VOZ1* actúa como un represor de la expresión de *TFL1*. Por otra parte, los resultados con la línea reportadora *TFL1*::GUS sugieren que esta represión tiene lugar sobre todo en la vasculatura (Fig. 3.1).

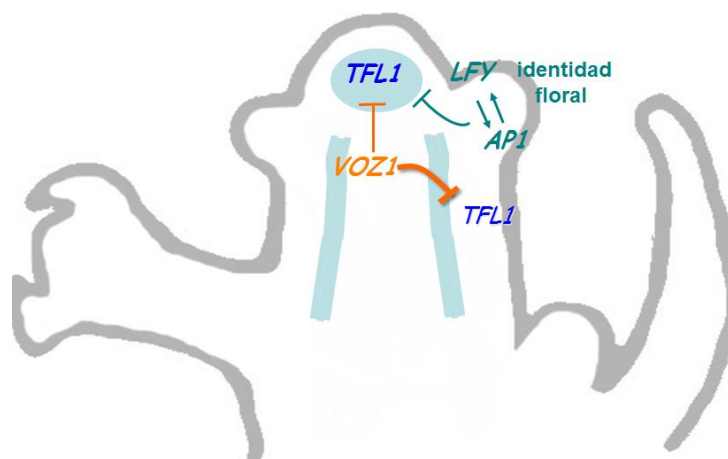


Figura 3.1. Modelo hipotético de la de la función de VOZ1 en la regulación de *TFL1*. Esquema que representa la posible acción de VOZ1 en la expresión de *TFL1* en el ápice de la inflorescencia de *Arabidopsis*. Se representa el ápice del tallo inflorescente; \vdash : represión ; \uparrow : activación.

Nuestros datos también indican que VOZ1 regula directamente la transcripción de *TFL1*. Así, los resultados de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) indican que la proteína VOZ1 se une *in vivo*, en células de *Arabidopsis*, al promotor de *TFL1*, en la región 2.8-3.1 del 3' donde se observó unión de VOZ1 en el escrutinio por híbrido simple en levaduras. En el experimento de ChIP se observó el enriquecimiento específico de un fragmento que solapa con una región de 82 bp donde se mapeó la unión de VOZ1 al promotor de *TFL1* en híbrido simple. Ese fragmento no contiene ninguna secuencia que coincida con el sitio de unión a DNA determinado para la proteína VOZ2 (Mitsuda *et al.*, 2004) pero sí contiene una secuencia parcialmente palindrómica, conservada en los ortólogos de *TFL1* de diferentes brasicáceas, que coincide con la secuencia consenso de unión para factores de transcripción de tipo NAC (Olsen *et al.*, 2005). Tal como se ha comentado, las proteínas VOZ contienen un dominio NAC divergente (Olsen *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que VOZ2 es capaz de unirse, en ensayos de retardo en gel, a un fragmento de DNA con un sitio de unión para factores NAC (Jensen *et al.*, 2010). Estos datos indican que VOZ1 se une directamente a ese sitio NAC en el promotor de *TFL1* y sugieren que regula directamente su transcripción.

Los resultados de los ensayos de activación de la Luciferasa también indican la interacción *in vivo* de VOZ1 con el promotor de *TFL1*. Así, la proteína VOZ1-VP16, donde el dominio de activación VP16 se fusionó a la proteína VOZ1, causa la activación de *TFL1::LUC*. Por otra parte, hemos visto que la proteína VOZ1 sola, sin el dominio VP16, de igual forma activa la expresión de *TFL1::LUC* en hojas de *N. benthamiana*.

(resultados no mostrados), lo que indica que en esos ensayos VOZ1 se comporta como un activador. Esos resultados están de acuerdo con los datos de Mitsuda et al (2004), que observaron que las proteínas VOZ son capaces de activar, en ensayos con células en cultivo de *Arabidopsis*, la expresión de una construcción promotor::GUS, pero no concuerdan con nuestros datos de expresión, que sugieren que VOZ1 reprime la expresión de *TFL1*. Una posibilidad es que VOZ1 sea capaz de actuar tanto como activador como de represor de la transcripción, algo que cada vez es más claro que ocurre con muchos factores de transcripción. Un ejemplo de este comportamiento dual es el del factor de transcripción, de tipo MADS, APETALA1 (AP1), regulador clave de la identidad del meristemo floral. Estudios de las proteínas AP1 de *Arabidopsis* y de otras especies han mostrado que la región C-terminal de AP1 contiene un dominio capaz de activar la transcripción en levaduras (Cho *et al.*, 1999), que no se encuentra, sin embargo, en otras proteínas MADS cercanas a AP1, tal como las proteínas tipo FUL, que no muestran capacidad de activación (Immink *et al.*, 2003; Litt, 2007). Sin embargo, actualmente se sabe que AP1 funciona no sólo como activador sino que también reprime la expresión de una parte importante de sus genes diana (Yu *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2010). Ese tipo de función dual posiblemente se debe a que factores como VOZ1 y AP1 se encuentran formando parte de complejos con otras proteínas que modulan su actividad, como se ha visto que ocurre en otros casos similares.

Existe además controversia en los datos sobre el efecto de los factores VOZ en la expresión de *TFL1*. Los resultados de nuestro análisis de la expresión de *TFL1* en ápices en bolting sugieren las proteínas VOZ actúan como represoras de *TFL1*. Sin embargo, en el experimento de micromatrices de Nakai *et al.* (2012) *TFL1* aparece como reprimido en plántulas del doble mutante, lo que sugiere que los factores VOZ actúen como activadores. Desafortunadamente, los resultados de nuestros análisis de expresión de *TFL1* en plántulas (datos no mostrados) no han sido suficientemente claros.Cuál es el efecto de los factores VOZ sobre la expresión de *TFL1* es, por tanto, una cuestión que necesita ser aclarada. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que la expresión de *TFL1* que se observa en los mutantes *voz* podría no depender exclusivamente de estos factores sino ser el resultado de la acción conjunta de diferentes reguladores. Sería interesante estudiar la expresión de *TFL1*, y de otros genes florales, en respuesta a VOZ1 en plantas transgénicas con versiones activables de los mismos, por ejemplo en líneas VOZ1-GR.

Nuestros ensayos activación de la Luciferasa muestran que la proteína VOZ2 también es capaz de activar al promotor de *TFL1*. Esto sugiere que VOZ2 también regula a *TFL1* y, en cierto modo, concuerda con la redundancia funcional de VOZ1 y VOZ2 en el control de la floración (que se discute más abajo). Como se ha comentado, se ha mostrado que VOZ2, además de ser capaz de reconocer la secuencia consenso determinada para su unión a DNA (Mitsuda et al., 2005), también es capaz de reconocer la secuencia de unión de los factores de transcripción tipo NAC (Jensen et al., 2010). Por tanto, parece razonable pensar que VOZ2 pueda unirse al sitio NAC en la región 2.8-3.2 del 3' de *TFL1* en la cual observamos la interacción de VOZ1. Se ha mostrado que VOZ2 se une al DNA en forma de dímero (Mitsuda *et al.*, 2004), del mismo modo que lo hacen otros factores de transcripción de la familia NAC (Jensen *et al.*, 2010). Los resultados de nuestros experimentos de BiFC indican que las proteínas VOZ1 y VOZ2 son capaces de interactuar entre sí. En conjunto, estos datos sugieren que el heterodímero VOZ1-VOZ2 podría jugar un papel relevante en la regulación de *TFL1* y en el control de la floración.

3.3. Los genes VOZ controlan redundantemente el tiempo de floración.

El análisis de líneas de inserción de T-DNA en los genes VOZ mostró que, aunque los mutantes simples en los genes VOZ1 o VOZ2 presentan un fenotipo indistinguible del silvestre, los dobles mutantes *voz1 voz2* presentan un retraso notable en la floración. Este resultado, que coincide con lo recientemente descrito por Yasui *et al.* (2012), muestra que los genes VOZ actúan redundantemente como promotores de la floración en Arabidopsis.

De acuerdo con un papel promotor de los genes VOZ en la floración, también observamos que la sobreexpresión de VOZ1 causa un ligero adelanto de la floración, adelanto que es más ostensible en plantas cultivadas en día corto. Además, en las líneas de sobreexpresión 35S::VOZ1, tanto en fondo Col como en fondo Ler, observamos la aparición de flores axilares en plantas cultivadas en día largo. El adelanto en el tiempo de floración y las flores axilares de las plantas 35S::VOZ1 recuerdan al fenotipo del mutante *tfl1* (Shannon y Meeks-Wagner, 1991; Alvarez *et al.*, 1992; Bradley et al., 1997), sugiriendo que VOZ1 también regule la arquitectura de la inflorescencia y la identidad de los meristemas. Así mismo, estos resultados concuerdan con la idea de que VOZ1 actúe como represor de *TFL1*. Es de señalar que el fenotipo de las plantas 35S::VOZ1 contrasta con el descrito recientemente por Yasui *et al.* (2012) para las plantas que sobreexpresan VOZ2, en las que no se observa cambios en el tiempo de floración respecto al silvestre.

Esta diferencia podría deberse a motivos tales como que en nuestras líneas 35::VOZ1 se alcancen niveles de expresión del transgén más elevados que en las 35S::VOZ2 de Yasui *et al.* (2012) o a diferencias en las condiciones de cultivo entre los dos laboratorios. No obstante, también es posible que reflejen diferencias entre las proteínas VOZ1 y VOZ2, tal como la ya mencionada de que VOZ1 se localiza en núcleo y citoplasma y VOZ2 sólo en citoplasma.

Otra discrepancia entre nuestros datos y los de Yasui *et al.* (2012) se da en el efecto del fotoperiodo en el fenotipo de floración de los mutantes en los genes VOZ. Así, mientras que en nuestros experimentos el retraso en el doble mutante y el adelanto en las líneas de sobreexpresión se observaba tanto en plantas cultivadas en condiciones de día largo como en día corto, en el estudio de Yasui *et al.* (2012) sólo observaron retraso de floración en los dobles mutantes cuando se cultivaban en día largo, mientras que en día corto florecían al mismo tiempo que el silvestre. Esta discrepancia probablemente sea debida a diferencias en las condiciones de cultivo entre los dos laboratorios y sugiere que el fenotipo de los mutantes en los genes VOZ presenta alta sensibilidad a condiciones ambientales. Esa aparentemente alta sensibilidad podría estar relacionada con el hecho de que los genes VOZ participan en la respuesta a diferentes señales del ambiente. Así, se hallan implicados en el control de la floración por la luz, a través de los fitocromos (Yasui *et al.*, 2010), y en respuesta a estrés abiótico, a el estrés por frío y a sequía (Nakai *et al.*, 2012).

3.4. ¿Cómo actúan los factores VOZ en la regulación de la floración?

Por lo discutido hasta este punto, los genes VOZ promueven la floración en *Arabidopsis*, posiblemente en respuesta a ciertos estímulos ambientales. ¿De qué manera actúan los factores VOZ para controlar la floración?

Los resultados presentados en este trabajo indican que las proteínas VOZ podrían actuar sobre la floración a través de *TFL1*. Dado que *TFL1* es un represor floral (Shannon y Meeks-Wagner, 1991; Bradley *et al.*, 1997) las proteínas VOZ podrían promover la floración reprimiendo su expresión.

¿Se halla todo el efecto de las proteínas VOZ sobre la floración mediado por la represión de *TFL1*? Si eso fuese así, la sobreexpresión de *TFL1*, que causa un notable retraso de la floración, debería ser epistática sobre la sobreexpresión de VOZ1, que causa

adelanto. Sin embargo, la sobreexpresión de *TFL1* no es epistática, sino que las plantas 35S::TFL1 35S::VOZ1 florecen antes que las plantas 35S::TFL1. Esto indica que las proteínas VOZ no actúan en la floración exclusivamente a través de *TFL1* sino que también deben actuar a través de otros reguladores.

De acuerdo con eso, el estudio de Yasui *et al.* (2012) muestra que la expresión de genes clave en el control de la floración se halla afectada en el doble mutante *voz1 voz2*. Así, observaron que en el doble mutante los niveles de *FT*, promotor de la floración, son más altos que en el silvestre y los del represor *FLC* son más bajos. Nuestros datos de expresión en el doble mutante y en las plantas 35S::VOZ1, aunque requieren confirmación, están de acuerdo con esas observaciones y, de acuerdo con lo propuesto por Yasui *et al.* (2012), sugieren que las proteínas VOZ actúan también controlando la expresión de esos reguladores florales.

Nuestros datos indican que VOZ1 es un regulador directo de *TFL1*, pero desconocemos si los factores VOZ también controlan de manera directa la expresión de otros genes florales. En un análisis preliminar de las regiones genómicas de *FT* y *FLC*, no detectamos secuencias que se ajusten al motivo de unión a DNA determinado para VOZ2 (Mitsuda *et al.*, 2004). Sin embargo, sí que encontramos varias secuencias que se ajustan a los motivos consenso de unión determinados para los factores de transcripción tipo NAC (Fig 3.2) (Olsen *et al.*, 2005).

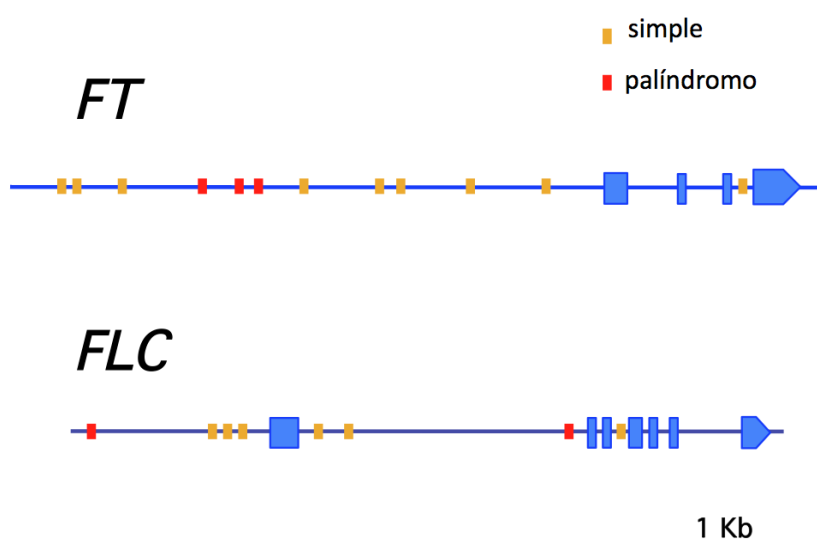


Fig 3.2. Motivos de unión para proteínas factores de transcripción tipo NAC en las regiones genómicas de *FT* y *FLC*. Las regiones 5' y los intrones se representan como una línea, los exones se representan como rectángulos azules, y los motivos de unión de proteínas NAC se representan como rectángulos naranja (motivos simples) o rojos (parejas de motivos).

Los factores NAC, incluidos los factores VOZ, se unen al DNA como dímeros y, consecuentemente, tienden a unirse a palíndromos formados por parejas de motivos (Mitsuda et al., 2004; Olsen *et al.*, 2005). Hay que señalar que sólo unos pocos de los posibles sitios de unión para factores NAC que identificamos en *FT* y *FLC* corresponden a parejas de motivos formando posibles palíndromos (Fig 3.2), y que en todos esos casos los palíndromos son imperfectos y la coincidencia de las secuencias con los consensos es baja. La coincidencia de los motivos simples identificados con las secuencias consenso es sin embargo mejor que la de las parejas. Hay datos que sugieren los factores NAC no sólo se unen a parejas de motivos sino que algunos genes diana de factores tipo NAC son regulados mediante la unión a motivos simples presentes en sus promotores (Olsen *et al.*, 2005). La capacidad de unirse a motivos simples podría deberse, por ejemplo, a que la proteína NAC se una al DNA en forma de complejo con otros factores de transcripción, lo que se ha visto que suele "relajar" la especificidad de la interacción (Chen, 1999); de hecho, se conocen ejemplos en que factores NAC actúan formando complejos con otros factores de transcripción (Weir *et al.*, 2004.). Sería interesante analizar si tiene lugar la unión de las proteínas VOZ a alguno de esos motivos NAC en los promotores de *FT* y/o *FLC* y, de una manera más general, llegar a elucidar cuáles son las dianas directas de los factores VOZ.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la proteína VOZ1, además de regular la expresión del gen *TFL1*, también interacciona en planta, en ensayos de BiFC, con la proteína TFL1, así como con su homólogo FT (Fig. 3.3). De acuerdo con estas observaciones, recientemente se identificó a MdVOZ1, el homólogo de VOZ1 de manzano, como capaz de interaccionar, en ensayos de doble híbrido en levadura, con MdFT2, uno de los homólogos de FT de manzano (Mimida *et al.*, 2011). Además también hemos visto que VOZ1 es capaz de interaccionar con otros reguladores florales, FLC, SVP y SOC1, así como con VOZ2 y con TCP7, un factor de transcripción posible regulador directo de la expresión de *TFL1* (Fig. 3.3) (Fernández-Nohales, 2011). La interacción con VOZ2 se observó exclusivamente en el citoplasma, de acuerdo con la alta inestabilidad de la proteína VOZ2 en el núcleo (Yasui *et al.*, 2011), sin embargo, el resto de heterodímeros se observaron en citoplasma y núcleo o sólo en el núcleo. Esto sugiere que la estabilidad de las proteínas VOZ en el núcleo podría variar dependiendo de la composición del complejo del que forme parte. Estos resultados abren la posibilidad de que los factores VOZ

contribuyan al control de la floración actuando también a otro nivel, modulando la actividad de los reguladores florales.

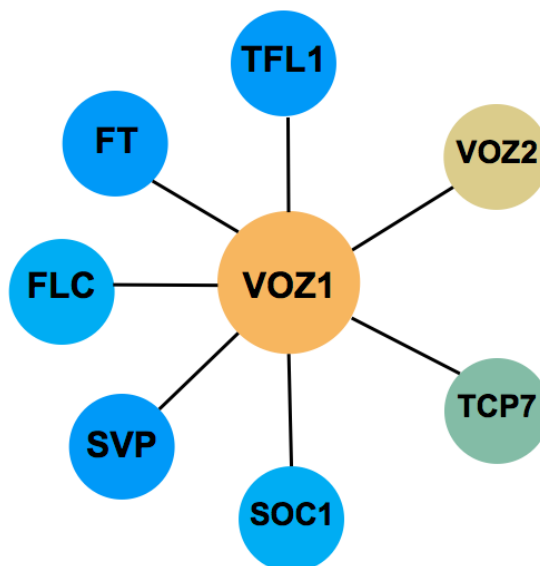


Figura 3.3. Esquema-resumen de las interacciones de la proteína VOZ1 con proteínas reguladoras de la floración y la arquitectura de la inflorescencia.

En resumen, como se representa en el modelo de la Figura 3.4, VOZ1 es un regulador directo de la expresión de *TFL1* y podría serlo también de otros genes florales clave, tales como *FT* y *FLC*. Por otra parte, la proteína VOZ1 también interacciona con las proteínas codificadas por esos genes así como con otros reguladores florales. Todo esto hace que sea tentador especular que los factores VOZ participen en el control de la floración conectando las distintas rutas genéticas, interaccionando a distintos niveles con componentes clave de las mismas.

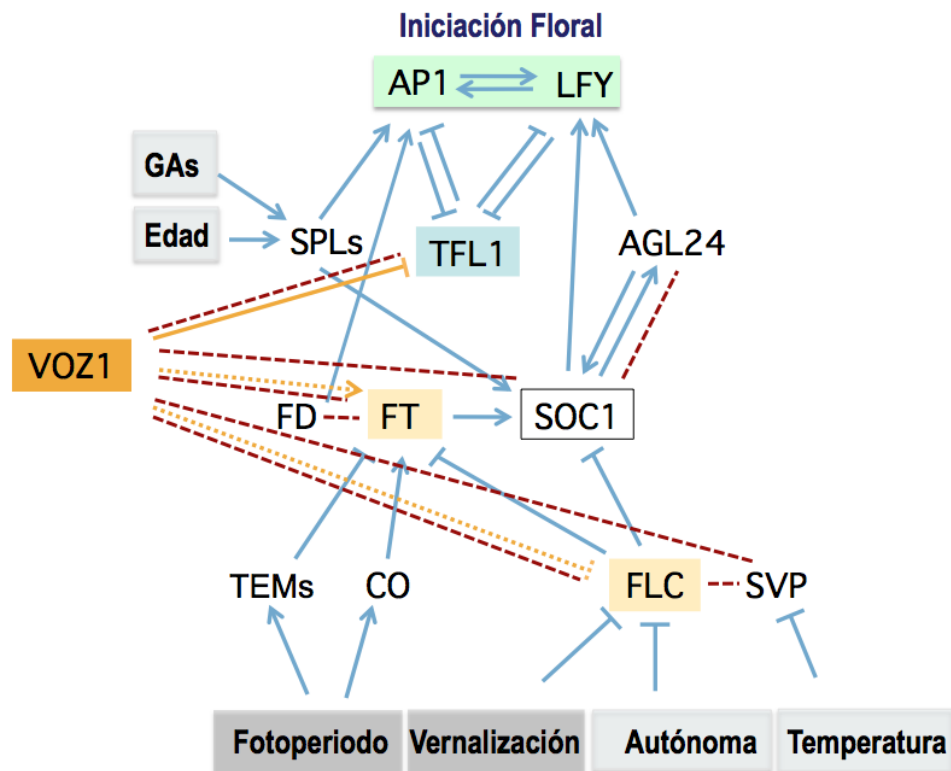


Figura 3.4. Modelo de la posible interacción de *VOZ1* con componentes de las principales rutas genéticas de la floración. Las líneas azules representan regulación de la expresión entre los componentes de las rutas de la floración y las líneas naranjas la posible regulación por *VOZ1* de la expresión (las líneas discontinuas naranjas indican que la interacción puede no ser directa); ↑: activación, ↓: represión. Las líneas discontinuas rojas representan interacción proteína-proteína.

4-CONCLUSIONES

Conclusiones

Los resultados presentados en esta memoria nos han permitido alcanzar las siguientes conclusiones acerca de la función de *VOZ1* y de su papel en la regulación del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*:

PRIMERA. El factor de transcripción *VOZ1* es un regulador directo de la expresión del gen *TFL1*, regulador clave de la floración y de la arquitectura de la inflorescencia.

SEGUNDA. El gen *VOZ1* es un nuevo regulador de la floración y de la arquitectura de la inflorescencia y ejerce esa función de manera redundante con su homólogo *VOZ2*.

TERCERA. *VOZ1* no ejerce su función de promotor de la floración exclusivamente a través de su actividad como regulador de *TFL1* sino que posiblemente también controla a otras rutas reguladoras de la floración.

CUARTA. Además de regular la transcripción de *TFL1*, la proteína *VOZ1* también interacciona físicamente con la proteína *TFL1* y con otros reguladores de la floración, lo que sugiere que los factores *VOZ* pueden interaccionar con las rutas reguladoras de la floración a distintos niveles.

5-MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal.

A continuación se describe el material vegetal utilizado durante la realización de este trabajo.

Tabla 5.1. Genotipos utilizados en este trabajo.

Línea.	Fondo genético.	Procedencia	Comentario/ referencia
35S::VOZ1	Col-0	Este trabajo	
35S::VOZ1	<i>LerPBG6</i>	Este trabajo	
35S::GFP::VOZ1	Col-0	Este trabajo	
35S::VOZ1::GFP	Col-0	Este trabajo	
35S::YFP::VOZ1	Col-0	Este trabajo	
pVOZ1::GUS	Col-0	Este trabajo	
<i>voz1-1</i>	Col-0	TAIR (WISCDSLOX4894920)	
<i>voz2-1</i>	Col-0	TAIR (SALK 042715.39.75)	
<i>voz2-2</i>	Col-0	TAIR (SALK 021718.54.75)	
<i>voz1-1 voz2-1</i>	Col-0	Este trabajo	
<i>voz1-1 voz2-2</i>	Col-0	Este trabajo	
<i>tf11-1</i>	Col-0	D. Bradley	Shannon y Meeks- Wagner, 1991
<i>tf11-2</i>	<i>Ler</i>	D. Bradley	Alvarez et al.,1992
Col -0			
<i>Ler</i>			
<i>LerPBG6</i>	<i>Ler</i>	Antonio Serrano- Mislata.	Línea delatora con la construcción TFL1pro::GUS que contiene la versión completa del promotor de TFL1 (2.2 Kb de la 5'NCS y 4.6 Kb de la 3'NCS). (Serrano-Mislata, 2010)
<i>gal-3</i>	Col-0	Miguel Ángel Blázquez	Sun et al, 1992.
<i>fve-3</i>	Col-0	José León	Koornneef <i>et al.</i> 1991.
<i>Nicotiana bentamiana</i>		Invernadero IBMCP.	
35S::FT	Col-0	D. Bradley	Kardailsky <i>et al.</i> , 1999.
35S::FLC	Col-0	R. Amasino	Michaels y Amasino, 2001.
35S::TFL1	Col-0	D. Bradley	Ratcliffe <i>et al.</i> , 1998.
35S::SVP	Col-0	H. Sommer	Masiero <i>et al.</i> , 2004.
35S::SOC1	Col-0	Miguel Ángel Blázquez	Lee <i>et al.</i> , 2000.
35S::AGL24	Col-0	Martin Kater	No publicada.

5.2. Microorganismos.

5.2.1. Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 5.2.

Tabla 5 .2. Cepas de bacterias utilizadas en este trabajo.

Cepa	Uso	Origen/Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Transformación de bacterias	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> Supercharge EZ10	Transformación de bacterias	Clontech
<i>Escherichia coli</i> One Shot ccdB Survival 2T1R Competent Cells	Transformación de bacterias para replicar plásmidos con el gen ccdB del sistema <i>Gateway</i>	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 pMP90	Transformación de Arabidopsis	Koncz, 1986

5.2.2. Cepas de levadura.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) utilizada en este trabajo se describe en la tabla 5.3.

Tabla 5.3. Cepa de levadura utilizada en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Procedencia
PJ69-4 α	<i>MATα</i> trp1-901 leu2-3,u1r1a23-5, <i>his3</i> -200gag1a41A8LOYASZ::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2metZ::GAL7-lacZ	James <i>et al.</i> , 1996

5.3. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 5.4.

Tabla 5.4. Plásmidos y características.

Nombre	Características	Uso	Procedencia
pGEM-T Easy	Amp ^r , <i>lacZ</i> , sitios de unión para los cebadores T7 y Sp6.	Clonación de productos de PCR	Promega
pCR8/GW/TOPO	Spec ^r , sitios de unión para los cebadores M13 directo, M13 reverso, GW1 y GW2.	Clonación de productos de PCR flanqueados por secuencias de recombinación del sistema Gateway	Invitrogen
pYFN43	Kan ^r	Vector de expresión. Generación de fusiones traducionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP	A. Ferrando, IBMCP
pYFC43	Kan ^r	Vector de expresión. Generación de fusiones traducionales a la mitad C-terminal de la proteína fluorescente YFP	A. Ferrando, IBMCP
pGreenII 0800-5 LUC	Kan ^r	Utilizado para la expresión del gen de la <i>LUCIFERASA</i> bajo el control de un promotor de interés. También sobreexpresa el gen de la <i>RENILA</i> .	pGreenII 62-SK
pEarleyGate104	Kan ^r (bacterias) y Basta ^r (plantas)	Clonaje y transformación de	Invitrogen

	contiene la proteína YFP.	Arabidopsis	
pMDC32	Kan ^r (bacterias) e Higromicina ^r (plantas).	Clonaje y transformación de Arabidopsis	Invitrogen
pMDC43	Kan ^r (bacterias) e Higromicina ^r (plantas).	Clonaje y transformación de Arabidopsis	Invitrogen
pMDC163	Kan ^r (bacterias) e Higromicina ^r (plantas).	Clonaje y transformación de Arabidopsis	Invitrogen
pHISi	HIS3 y URA3 marcadores de selección en levaduras	Vector cebo empleado en el híbrido simple.	Clontech
pGADT7rec	LEU marcador de selección en levadura	Vector presa empleado en el híbrido simple.	Clontech
pJA10	pCR8/GW/TOPO que contiene la secuencia codificante de VOZ1.	Vector donar, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.	Este trabajo
pJA11	Plásmido pMDC 32 que contiene la construcción 35S::VOZ1	Clonaje y transformación de Arabidopsis	Este trabajo
pJA12	Plásmido pEARLEYGATE 104 que contiene la construcción 35S::YFP::VOZ1	Clonaje y transformación de Arabidopsis	Este trabajo
pJA13	Plásmido pMDC 43 que contiene la construcción 35S::GFP::VOZ1	Clonaje y transformación de Arabidopsis	Este trabajo

pJA14	pCR8/GW/TOPO que contiene el fragmento VOZ1-VP16.	Vector donar, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.	Este trabajo
pJA15	Plásmido pMDC 32 que contiene la construcción 35S::VOZ1-VP16	Clonaje y transformación de Arabidopsis	Este trabajo
pJA16	pCR8/GW/TOPO que contiene el fragmento VOZ2-VP16.	Vector donar, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.	Este trabajo
pJA17	Plásmido pMDC 32 que contiene la construcción 35S::VOZ2-VP16	Clonaje y transformación de Arabidopsis	Este trabajo
pJA18	pCR8/GW/TOPO que contiene el promotor del gen <i>VOZ1</i>	Vector donar, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.	Este trabajo
pJA19	Plásmido pMDC 163 que contiene la construcción pVOZ1::GUS.	Clonaje y transformación de Arabidopsis	Este trabajo
pJA20	pGEM-T Easy que contiene el fragmento 2.2 kb de la region hacia el 5' del promotor de <i>TFL1</i> .	Clonación de productos de PCR.	Este trabajo
pJA21	pGEM-T Easy que contiene el fragmento 4.5 kb de la region hacia el 3' del promotor de <i>TFL1</i> .	Clonación de productos de PCR.	Este trabajo
pJA22	Plásmido pGreenII 0800-5 LUC que contiene la	Utilizado para la expresión del gen de la <i>LUCIFERASA</i> bajo el	Este trabajo

	construcción TFL1::LUC	control de un promotor de interés. También sobreexpresa el gen de la <i>RENILA</i> .	
pJA23	pGEM-T Easy que contiene el fragment F1 117 pb de la region 2.8-3.2 del promotor de <i>TFLI</i>	Clonación de productos de PCR	Este trabajo
pJA24	pGEM-T Easy que contiene el fragment F2 146 pb de la region 2.8-3.2 del promotor de <i>TFLI</i>	Clonación de productos de PCR	Este trabajo
pJA25	pGEM-T Easy que contiene el fragment F3 147 pb de la region 2.8-3.2 del promotor de <i>TFLI</i>	Clonación de productos de PCR	Este trabajo
pJA26	pGEM-T Easy que contiene el fragment F4 98 pb de la region 2.8-3.2 del promotor de <i>TFLI</i>	Clonación de productos de PCR	Este trabajo
pJA27	pGEM-T Easy que contiene el fragment completo F5 418 pb 2.8-3.2 pb del promotor de <i>TFLI</i>	Clonación de productos de PCR	Este trabajo
pJA28	pGEM-T Easy que contiene la region codificante de <i>VOZI</i>	Clonación de productos de PCR	Este trabajo
pJA29	Plásmido pGADT7rec que contiene la construcción VOZ1 presa, para el híbrido simple.	Vector presa empleado en el híbrido simple.	Este trabajo

pJA29	Plásmido pYFC43 que contiene la construcción pYFC-VOZ1	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad C-terminal de la proteína fluorescente YFP	Este trabajo
pJA30	Plásmido pYFN43 que contiene la construcción pYFN-TCP7	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP	Este trabajo
pJA31	Plásmido pYFN43 que contiene la construcción pYFN-SVP	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP	Este trabajo
pJA32	Plásmido pYFN43 que contiene la construcción pYFN-SOC1	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP	Este trabajo
pJA33	Plásmido pYFN43 que contiene la construcción pYFN-AGL24	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP	Este trabajo
pJA34	Plásmido pYFN43 que contiene la construcción pYFN-VOZ2	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente	Este trabajo

		YFP	
pJA35	Plásmido pYFN43 que contiene la construcción pYFN-FT	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP	Este trabajo
pJA36	Plásmido pYFN43 que contiene la construcción pYFN-CO	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP	Este trabajo
pJA37	Plásmido pYFN43 que contiene la construcción pYFN-FLC	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP	Este trabajo
pJA38	Plásmido pHISi que contiene el fragmento completo de la región 2.8-3.2 del promotor de <i>TFL1</i>	Vector cebo empleado en el híbrido simple	Clontech
pJA39	Plásmido pHISi que contiene el fragmento F1 de la región 2.8-3.2 del promotor de <i>TFL1</i>	Vector cebo empleado en el híbrido simple	Clontech
pJA40	Plásmido pHISi que contiene el fragmento F2 de la región 2.8-3.2 del promotor de <i>TFL1</i>	Vector cebo empleado en el híbrido simple	Clontech

pJA41	Plásmido pHISi que contiene el fragmento F3 de la región 2.8-3.2 del promotor de <i>TFL1</i>	Vector cebo empleado en el híbrido simple	Clontech
pJA42	Plásmido pHISi que contiene el fragmento F4 de la región 2.8-3.2 del promotor de <i>TFL1</i>	Vector cebo empleado en el híbrido simple	Clontech
pBSKTFL1	Plásmido que contiene el fragmento con la región genómica de <i>AtTFL1</i> ecotipo <i>Ler</i>	Plásmido desde donde se aislaron los distintos fragmentos de TFL1.	Serrano- Mislata, 2010
pFN90	pCR8/GW/TOPO que contiene la región codificante de ATG-STOP del gen <i>TCP7</i>	Vector donador, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.	Fernández-Nohales, 2011
pFN80	pCR8/GW/TOPO que contiene la región codificante del gen <i>FLC</i>	Vector donador, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.	Fernández-Nohales, 2011
pDORN 201-FT	p201 que contiene la región codificante del gen <i>FT</i>	Vector donador, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.	José León
pDORN 201- SVP	p201 que contiene la región codificante del gen <i>SVP</i>	Vector donador, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.	
pDORN 201- SOCI	p201 que contiene la región codificante del gen <i>SOCI</i>	Vector donador, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.	

pDORN 201- <i>AGL24</i>	p201 que contiene la región codificante del gen <i>AGL24</i>	Vector donador, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.
pDORN 201- <i>CO</i>	p201 que contiene la región codificante del gen <i>CO</i>	Vector donador, utilizado para clonar en diferentes vectores de destino.

5.4. Oligonucleótidos.

Los cebadores utilizados en este trabajo se describen en la tabla 5.5.

Tabla 5.5. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia	Tm	Secuencia que aparece	Orientación
oJA1	5'TAGCAGCTGGTAACAATTTTCG3'	67	CDS <i>VOZ1</i>	Oligonucleótido interno para secuenciar
oJA2	5'ATCGGTCGGGGGGGCATGGGGG ATATAATAGTCGC3'	65	CDS <i>VOZ1</i> - VP16	Reverso
oJA10	5'TCAAGGATAAGGCTAAGAACCGT G3'	72	Genotipo mutante <i>voz1</i>	Directo
oJA11	5'AGAGGGTGGAGGACAAATAGTCG 3'	74	Genotipo mutante <i>voz1</i>	Reverso
oJA12	5'TACGTACGTCGAGGCTAGGAGAC TTCGTTGATC3'	82	Promotor TFL1	Directo 2.2
oJA13	5'TCCATGGCCATTTTCTTTTGTTAA CTTAGAG 3'	53	Promotor TFL1	Reverso 2.2
oJA14	5'ATCTAGAGGTACCAAGTTGAAGT CTCTCATTGACGAAC 3'	59	Promotor TFL1	Reverso 4.5
oJA19	5'TTGTTGATAATTGCAAAGATTTG 3'	65	CDS <i>VOZ2</i>	Oligonucleótido interno para secuenciar
oJA24	5'CTTCAAGGATAAGGCTAAGAACC GT 3'	73	CDS <i>VOZ1</i>	Directo
oJA25	5' AAAGCATGCCTTGCAAAATCAT 3'	66	CDS <i>VOZ1</i>	Reverso
oJA26	5'ATGTCAAACCAACCGAAGATCAC A 3'	59	CDS <i>VOZ2</i>	Directo
oJA27	5'TCACTCCTTACGACCTTTGGTTGG 3'	59	CDS <i>VOZ2</i>	Reverso

oJA28	5'TCATTATGAAAGAGACATTGAGAT GT 3'	71	Promotor <i>VOZ1</i>	Directo
oJA29	5'AAGAAATCTCACCTCCCCACCA 3'	71	Promotor <i>VOZ1</i>	Reverso
oJA30	5'ATCGGTCGGGGGGGCATGCTCC TTACGACCTTTGGTTGG 3'	72	CDS <i>VOZ2</i> - <i>VP16</i>	Reverso
oJA31	5'GAATTCTAATTGACTCTCGAGGA CAAAC 3'	58	Promotor TFL1- Hibrido simple	Directo
oJA32	5'TCTAGATAGG GTT AGT ATG TTT CTT GCT 3'	55	Promotor TFL1- Hibrido simple	Reverso
oJA33	5'GAATTCT AAA AGA GAA AGC AAG AAA CATAC 3'	54	Promotor TFL1- Hibrido simple	Directo
oJA34	5'TCTAGA T 3' CGA CTC TTC GAC ACG TTA ACC 3'	60	Promotor TFL1- Hibrido simple	Reverso
oJA35	5'GAATTCTAATTGGATTGGTTAACG TGTC 3'	55	Promotor TFL1- Hibrido simple	Directo
oJA36	5'TCTAGATGAATTTACTTTGTCTAC ATGTATG 3'	53	Promotor TFL1- Hibrido simple	Reverso
oJA37	5'GAATTCTTTTACACATACATGTAG ACAAAGT 3'	54	Promotor TFL1- Hibrido simple	Directo
oJA38	5'TCTAGATATTATGGGTTAGCTATA AAGATGG 3'	54	Promotor TFL1- Hibrido simple	Reverso
oJA39	5' CTCTCGAGGACAAACCAACATG 3'	56	Promotor TFL1- ChIP	Directo
oJA40	5' GGTCGTCTCTTTTAATCGTAAGGTT ATT 3'	55	Promotor TFL1- ChIP	Reverso
oJA41	5'ACAACAAGTAACCAACATAAAGTG ACG 3'	56	Promotor TFL1- ChIP	Directo
oJA42	5' CATGTATGTGTAAATGTACCTCCTC GT 3'	56	Promotor TFL1- ChIP	Reverso

oJA43	5'TGGCTCCTCAGGGACTCACTACA A 3'	65	qRT-PCR <i>CO</i>	Directo
oJA44	5'TTGACTCCGGCACAACACCAGT 3'	65	qRT-PCR <i>CO</i>	Reverso
oJA45	5'CGAGTAACGAACGGTGATGA 3'	20	qRT-PCR <i>FT</i>	Directo
oJA46	5'CGCATCACACACTATATAAGTAAA ACA 3'	27	qRT-PCR <i>FT</i>	Reverso
oJA47	5'AGCTGCAGAAAACGAGAAGCTCT CTG 3'	26	qRT-PCR <i>SOC1</i>	Directo
oJA48	5'GGGCTACTCTCTTCATCACCTCTT CC 3'	26	qRT-PCR <i>SOC1</i>	Reverso
oJA49	5'GAGGCTTTGGAGACAGAGTCGGT GA 3'	68	qRT-PCR <i>AGL24</i>	Directo
oJA50	5' AGATGGAAGCCCAAGCTTCAGGGA A 3'	69	qRT-PCR <i>AGL24</i>	Reverso
oJA51	5' TGGTTTGACGCGTGTGATTG 3'	62	qRT-PCR <i>SVP</i>	Directo
oJA52	5'CCCTTTTTCTGAAGTTCGCTGA 3'	61	qRT-PCR <i>SVP</i>	Reverso
oJA53	5'TTCAACTGGAGGAACACCTTGA 3'	61	qRT-PCR <i>FLC</i>	Directo
oJA54	5'CATGAGTTCGGTCTTCTTGGC 3'	61	qRT-PCR <i>FLC</i>	Reverso
oJA55	5'AAATGCCCCACCAAGGTGACGAA C 3'	70	qRT-PCR <i>LFY</i>	Directo
oJA56	5'ACTCGCTCCTGATTTCTTCGCGTA 3'	66	qRT-PCR <i>LFY</i>	Reverso
Pedrol 61	5'ATGACGGGGAAGCGATCAAAGA 3'	60	CDS <i>VOZ1</i>	Directo
Pedrol 62	5'TCTAGATCAGGGGATATAATAGTC GCTTAG 3'	64	CDS <i>VOZ1</i>	Reverso
Pedrol 63	5'TCTAGAGGGGATATAATAGTCGC TTAG 3'	56	CDS <i>VOZ1- STOP</i>	Reverso
Pedrol 76	5'AAGAGAGAAGCAAACTGGGC 3'	58	Genotipo mutante <i>voz1</i>	Reverso
Pedrol 77	5'TGGAGGAGAAGCTAAGGGAAC 3'	58	Genotipo mutante <i>voz1</i>	Directo
Pedrol 114	5'AAGCAAAGACGTGTTATCTTTCCT AAT 3'	58	qRT-PCR <i>TFL1</i>	Directo
Pedrol 115	5'GTTGAAGTGATCTCTCGAAGGGA T 3'	58	qRT-PCR <i>TFL1</i>	Reverso

745 wisc	5' AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGT TGTC 3'	65	T-DNA <i>voz1</i>	Reverso
LBb1.3	5' ATTTTGCCGATTTCGGAAC 3'	63	T-DNA <i>voz2</i>	Reverso

5.5. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de *Arabidopsis*.

5.5.1 Cultivo de *Arabidopsis* en invernadero.

Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron en alveolos, de 6.5 x 6.5 x 5 cm, o en macetas, de 11 ó 13 cm de diámetro, según el tipo de experimento a realizar, con una mezcla 2:1:1 de turba negra:perlita:vermiculita. Tras la siembra, los alveolos y/o las macetas se colocaron en bandejas que se regaron abundantemente y se cubrieron con un plástico para mantener una humedad alta durante la germinación y evitar contaminaciones de otras semillas. Las semillas se estratificaron durante 3-4 días en oscuridad a 4 °C para sincronizar la germinación, tras lo cual las bandejas se pasaron a la cabina de cultivo o al invernadero. Cuando las plántulas habían desarrollado el primer par de hojas, o la condensación era muy alta, se agujereó el plástico en varios puntos y 3-4 días después, se retiró completamente. Las plantas fueron regadas por inmersión una vez a la semana con agua potable y otra vez con solución Hoagland nº 1 suplementada con oligoelementos (John Hewitt, 1966).

Dentro de las cámaras de cultivo, la iluminación procedía de tubos fluorescentes *Sylvania Standard F58W/133-T8* que emitían luz blanca fría con un flujo de 4600 lm. Las plantas se cultivaron bajo dos fotoperiodos diferentes: día largo, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, o día corto, 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. La temperatura se mantuvo estable entre 21 y 23 °C. En el caso de cultivarse en el invernadero, siempre fue bajo condiciones de día largo con luz natural, en ocasiones suplementada con luz artificial, y la temperatura se mantuvo estable entre 21 y 23 °C.

5.5.2. Tratamiento de *Arabidopsis* con giberelinas.

Para observar el efecto de las giberelinas en la floración de los mutantes *voz* se realizó el siguiente ensayo.

Se estratificaron 40 semillas por genotipo (Col-0, *voz1 voz2* y, como control del experimento, el mutante *gal-3*) en tubos de 1.5 ml con GA₃, a 4 °C durante 4 días en oscuridad. Posteriormente, se sembraron en alveolos 16 semillas de cada uno de los

distintos genotipos, que se cultivaron en condiciones de día largo. Tras la germinación, las plantas se trataron dos veces por semana con la hormona GA₃, a una concentración de 100µM. Tras la germinación se analizó el tiempo de floración, contabilizando el número de hojas producidas por el tallo principal, y determinando el día de *bolting*, considerando el día de bolting cuando el tallo principal había crecido hasta aproximadamente 0,5 cm de longitud. Paralelamente, como control, se cultivaron plantas, en las mismas condiciones, pero sin sometarlas a tratamiento con giberelinas.

5.5.3. Tratamiento de vernalización.

Con la finalidad de analizar el efecto de la vernalización sobre la floración en los mutantes *voz* se realizó lo siguiente.

Se sembraron 16 plantas por genotipo (Col-0, *voz1 voz2* y, como control del experimento, el mutante *fve-3*), estas plantas se incubaron durante cuatro semanas a 4° C y en oscuridad (tratamiento de vernalización). Tras este tratamiento, las plantas se cultivaron en condiciones de día largo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 21° C y se procedió a analizar el tiempo de floración, determinando la fecha del *bolting* y contabilizando el número de hojas producidas por el tallo principal. Paralelamente, como control, se cultivaron plantas de los mismos genotipos que no fueron sometidas a vernalización.

5.5.4. Cultivo de Arabidopsis *in vitro*.

Para el cultivo *in vitro*, las semillas de Arabidopsis se esterilizaron, dentro de una campana de flujo laminar, con una solución compuesta por etanol al 70% (v/v) y Tritón-X-100 al 0.005% (v/v) durante 3 minutos con agitación. A continuación, las semillas se lavaron con etanol al 96% (v/v) durante 1 minuto con agitación, y se dejaron secar antes de distribuirlas en cajas de Petri, de 15 cm de diámetro, con medio de selección. Estas cajas se sellaron con cinta *Micropore™ 3M Surgical Tape* para facilitar el intercambio de gases.

El medio de selección estaba compuesto por 2.2 g/L de sales MS (Duchefa), 20 g/L de sacarosa, 0.1 g/L MES y 6.0 g/L de agar, pH 5.9. Además, en ocasiones se utilizó como medida profiláctica timentina (300 µg/L). Como agentes selectivos se utilizaron kanamicina (50 µg/L) o glufosinato de amonio (15 µg/mL), también conocido como *Basta* (Bayer CropScience).

Las semillas se estratificaron durante 3-4 días a 4 °C en oscuridad. A continuación, las cajas de Petri se trasladaron a cabinas de cultivo *in vitro* con fotoperiodo de día largo y temperatura constante de 24 °C. La luz fue proporcionada por tubos fluorescentes *Sylvania Gro Lux 36W* que emitían luz blanca fría con un flujo de 850 lm.

5.5.5. Fertilización cruzada.

Para realizar cruzamientos entre los diferentes genotipos de *Arabidopsis*, se emascularon las flores receptoras con unas pinzas, retirando todos los órganos excepto el pistilo sobre el que se depositó el polen de las plantas donantes. Las silicuas maduras resultantes de estos cruces se recogieron una vez las valvas empezaron a abrirse.

5.5.6. Conservación de semillas.

Una vez las plantas de *Arabidopsis* habían completado su ciclo vital, se recogieron las semillas que se dejaron secando durante 7 días a 37 °C. A continuación, se almacenaron estas semillas dentro de una cámara con una temperatura de 10 °C, una humedad aproximada del 25% y en oscuridad.

5.5.7. Generación de plantas transgénicas mediante infiltración al vacío.

Para la generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con las diferentes construcciones generadas en este trabajo se utilizaron los ecotipos silvestres *Columbia* (Col) y *Landsberg erecta* (Ler).. La transformación se realizó según el protocolo de infiltración por vacío descrito en Bechtold *et al.* (1993) con algunas modificaciones introducidas en Clough y Bent (1998).

Aproximadamente 60 semillas de *Arabidopsis* se cultivaron en macetas de 11 cm de diámetro en condiciones de día largo. Unas dos semanas después de la siembra, se eliminaron algunas plantas para facilitar el crecimiento homogéneo de la población. Cuando la altura de las plantas era de unos 10 cm, aproximadamente tras un mes de cultivo, se decapitó el ápice de la inflorescencia principal, induciendo de este modo la proliferación de las inflorescencias de roseta. Tras la decapitación del ápice, las plantas se cultivaron durante 4 días más en día largo antes de la infiltración.

Tres días antes de la infiltración, se inoculó la cepa de *A. tumefaciens*, en nuestro caso C58 pMP90, con la construcción de interés en un tubo de 50 mL con 10 mL de LB (ver apartado 5.6.1) más rifampicina y el antibiótico correspondiente a la resistencia conferida por el plásmido que portaba el *Agrobacterium*. Este precultivo se incubó durante toda la noche en oscuridad a 28°C con agitación de 200 rpm. A la mañana siguiente, se inoculó el precultivo en un matraz de 1 L que contenía 600 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente. Este cultivo se incubó en las mismas condiciones durante 48 horas. El día de la infiltración se centrifugó el cultivo a 6000 rpm durante 15 minutos, y el sedimento obtenido se resuspendió en 200 mL de medio de infiltración (sales MS 2.2 g/L, sacarosa 5% (p/v), BAP 1.0 mg/L, MES 100 mg/L, pH 5.9) al que se le había añadido detergente *Silwet L.77* (Lehle Seeds), a una concentración final de 0.05% (v/v).

Antes de la infiltración, se eliminaron todas las flores abiertas y las silicuas fertilizadas de las plantas. Para llevar a cabo la infiltración, las inflorescencias se sumergieron durante 8 seg en un recipiente con los 200 mL de la suspensión de *A. tumefaciens* en medio de infiltración. Inmediatamente después, se sometió a las plantas a un pulso de vacío de 1 minuto. A continuación, se secaron ligeramente las plantas con papel absorbente, se cubrieron con bolsas de plástico y se continuaron cultivando en condiciones de día largo. Durante los días siguientes se agujerearon las bolsas de plástico, permitiendo que las plantas se aclimataran gradualmente. Las plantas se cultivaron en el invernadero hasta que se obtuvieron las semillas maduras.

5.6. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de bacterias.

5.6.1 Medios y condiciones de cultivo.

Los cultivos líquidos de *E. coli* y *A. tumefaciens* se incubaron toda la noche a 37 °C o a 28 °C, respectivamente, con agitación de 200 rpm. Los cultivos en medio sólido se incubaron a 37 °C durante una noche para *E. coli*, o a 28 °C durante 2 días para *A. tumefaciens*.

Las bacterias se cultivaron en medio LB, compuesto por triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v) y NaCl 1% (p/v), pH 7.0. El medio sólido se obtuvo añadiendo agar 2% (p/v).

Tabla. 5.6 Antibióticos y concentraciones de uso para la selección de bacterias transformadas.

Antibiótico	Concentración (µg/mL)	Bacteria
Ampicilina	100	<i>E. coli</i>
Kanamicina	50	<i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>
Espectinomicina	100	<i>E. coli</i>
Tetraciclina	10	<i>E. coli</i>
Rifampicina	100	<i>A. tumefaciens</i>
Higromicina	20	<i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>
Basta	15	<i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>
Gentamicina	20/50	<i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>

5.6.2 Transformación de células competentes de *E.coli* por electroporación.

La transformación de células de *E.coli* se utilizó para amplificar el DNA plasmídico. Para ello, en primer lugar se descongeló en hielo una alícuota de células competentes. A continuación se añadió entre 1-2µl (20-200ng) de DNA y se homogenizó. La mezcla se introdujo en una cubeta de 0.1cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo y se sometió a un pulso eléctrico. Para ello se utilizó el aparato Gene Pulse™ (BioRad), con las condiciones que se describen en la Tabla 5.7.

Tabla. 5.7. Condiciones para la electroporación de *E coli*.

Células	Ω	µF	kV
<i>E. coli</i>	200	25	1.8

Tras el pulso eléctrico se añadió a la cubeta 1 ml de LB. Las células se transfirieron a un tubo limpio y se incubaron 1 h a 37°C y 220 rpm. Transcurrido ese tiempo se plaquearon 50µl y el resto en dos placas de LB sólido con el antibiótico adecuado. Las bacterias se incuaban a 37°C o/n.

5.6.3 Transformación de células competentes de *A. tumefaciens* por electroporación.

La transformación de células de *A. tumefaciens* se utiliza para la obtención de plantas transgénicas o para la expresión transitoria en tabaco. Se utilizaron dos cepas de *A. tumefaciens*, la C58PMP90 en el caso de tratarse de un plásmido binario y la C58 portadora del plásmido auxiliar pSoup, para aquellos plásmidos que no poseían todas las funciones *trans* necesarias para la integración del T-DNA. Al igual que en el caso de *E.coli* en primer lugar se descongeló en hielo una alícuota de células competentes. A continuación se añadió 1µl (20-200ng) de DNA y se homogenizó. La mezcla se introdujo en una cubeta de 0.1cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo y sometió a un pulso eléctrico. Para ello se utilizó el aparato Gene Pulse™ (BioRad), con las siguientes condiciones que se describen en la tabla 5.7.:

Tabla. 5.7. Condiciones para electroporación de *A. tumefaciens*

Células	Ω	µF	kV
<i>A. tumefaciens</i>	400	25	1.8

Tras la electroporación se añadió 1 ml de LB a la cubeta. Las células se transfirieron a un tubo limpio y se incubaron 3h a 28°C y 200 rpm. Transcurrido ese tiempo se plaquearon 50µl y el resto en dos placas de LB sólido con el antibiótico adecuado. Las bacterias se incubaron a 28°C durante 2 días.

5.7. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de levaduras.

5.7.1 Medios y condiciones de cultivo.

Para los cultivos de células de levadura sin auxotrofías en medio líquido se utilizó medio YPD (extracto de levadura 1% (p/v), bactopectona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v)), con agitación a 200 rpm e incubación a 30 °C. Para el crecimiento en soporte sólido se utilizó el mismo medio YPD con agar 2% (p/v) y las placas se incubaron durante 24-72 h a 30 °C.

Las cepas auxótrofas transformadas con plásmidos fueron cultivadas en medio selectivo. Se utilizó medio mínimo SD (base nitrogenada para levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico 0.17% (p/v), (NH₄)₂SO₄ 0.5% (p/v), glucosa 2% (p/v)) suplementado con los aminoácidos requeridos en cada caso (uracilo (100 mg/L), leucina (100 mg/L),

triptófano (20 mg/L), histidina (20 mg/L), adenina (100 mg/L)).

5.7.2 Transformación de levaduras (integración de insertos en el genoma)

Para transformar la cepa de levadura utilizada en este trabajo PJ69-4 α , se utilizó un protocolo óptimo para la integración de insertos en el genoma, mediante el cual se introdujeron los distintos fragmentos del promotor de *TFL1* en el cromosoma de la levadura, para realizar el ensayo de híbrido simple. Las células se cultivaron en 50 ml de medio selectivo SD- completo durante toda la noche. Posteriormente cuando la OD > 1.5, se diluyó a 0.1 en un matraz de 1L con 300 ml de SD- completo, luego se incubó durante 3 horas aproximadamente hasta obtener una OD entre 0.4 y 0.6, y posteriormente se centrifugó a 2300 rpm durante 5' a temperatura ambiente, en 6 tubos de 50 ml. Después se resuspendieron todos los sedimentos en agua y se volvió a centrifugar. A continuación se añadieron todos los sedimentos a un mismo tubo, se resuspendieron en agua y se centrifugaron de nuevo. El sedimento obtenido se resuspendió en 1.5 ml de 1xTE/1xLiAc recién preparado. Esta suspensión contenía las células competentes, que se utilizaron para la transformación. Para cada muestra a transformar se añadieron 200 μ l de la suspensión de células competentes, 20 μ l de ssDNA 1% , el DNA a transformar (para el caso de integraciones unos 8-12 μ g de DNA digerido y concentrado por purificación en columna en un volumen de 15L), y 1.2 ml de una solución PEG/LiAC fresca; esta mezcla se vorteo a máxima velocidad durante un minuto, luego se incubó a 30 °C durante 10 min a 200 rpm, se añadieron 140 μ l de DMSO a cada tubo, se agitó con suavidad y se aplicó un choque de calor a 42 °C durante 45 min en un baño de agua. Se colocaron las células en hielo durante un minuto, se centrifugó a 2300 rpm a temperatura ambiente con el fin de recoger el sedimento, se resuspendió cada tubo con 500 μ l de agua y por último se extendieron las células en placas con medio sólido.

5.7.3 Transformación simple de levaduras.

Las células de levaduras fueron cultivadas previamente en YPD sólido durante un periodo no superior a 48 horas. En primer lugar, se mezclaron 5 μ l de ssDNA 1% (previamente calentado a 95° C durante 5 min) con un volumen de entre 5 – 10 μ l del DNA a introducir. A esta mezcla se añadió agua estéril hasta un volumen final de 50 μ l, tras lo que se añadieron las células de levadura a transformar, en un volumen aproximado al que

puede contener la punta de asa de siembra. Finalmente, se añadieron 500 µl de solución PLATE (40% PEG 4000, 100 mM de acetato de litio, 10 mM Tris pH7.5 y 0.4 mM EDTA) y se mezcló todo ello intensamente. Después de incubar la mezcla un mínimo de 16 horas a temperatura ambiente, se calentó a 42° C durante 15 min tras lo que se recogieron las células por centrifugación a 13.000 rpm durante 2 min. Por último, se resuspendieron las células en 200 µl de agua estéril y se extendieron en placas de medio selectivo.

5.8. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.

5.8.1. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*.

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala, se partió de cultivos de 3 mL, en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, incubados toda la noche a 37 °C con agitación. Las preparaciones se realizaron con el sistema Fast Plasmid Mini Kit (Eppendorf), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para las preparaciones de DNA plasmídico a mediana escala, se partió de cultivos de 50 mL, en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Los cultivos se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación. Las preparaciones se realizaron con el sistema *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.8.2. Extracción de DNA plasmídico de *A. tumefaciens*.

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico de *A. tumefaciens*, se partió de cultivos de 3 mL, en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido a aislar y rifampicina, incubados toda la noche a 28° C con agitación. Las preparaciones se realizaron según el método de la lisis alcalina descrito en Sambrook *et al.* (1989), precipitándose con etanol absoluto el sobrenadante obtenido tras el tratamiento con la solución III y posteriormente, resuspendiéndose en tampón TE (EDTA 1.0 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0). Como la pureza y el rendimiento de la preparación de DNA obtenida de esta forma eran muy bajos, se utilizó 1 µL de la misma para transformar *E. coli* y a partir de dos clones recombinantes, se realizaron nuevas preparaciones de DNA plasmídico para su análisis.

5.8.3 Extracción rápida de DNA genómico de Arabidopsis

Este método rápido (Berendzen *et al.*, 2005) es el que se utilizó normalmente para extraer DNA genómico de Arabidopsis, que se usaba como molde para PCRs en experimentos de genotipado.

Se partió de aproximadamente 10 mg de material (una hoja joven pequeña o un disco del tamaño de una tapa de eppendorf) y se congeló la muestra en nitrógeno líquido. A continuación se añadieron 100 µl de la disolución de sacarosa y se machacó el tejido con la ayuda de una varilla de plástico autoclavada. Posteriormente se añadieron 100µl más de la disolución y se incubó inmediatamente a 95-100°C durante 10 min. Tras ser centrifugado se transfirieron 100µl del sobrenadante, que contiene el DNA genómico, a un tubo nuevo.

Solución:

Disolución de sacarosa.

		<u>Stock</u>
50mM Tris-HCl (pH 7.5)	0.5ml	2M
300mM NaCl	1.2ml	5M
300mM Sacarosa	2gr	
H ₂ O		

Volumen final	20ml	

5.8.4. Extracción de DNA genómico de alta calidad de Arabidopsis.

En ocasiones en que el DNA obtenido según el método anterior no fue suficientemente bueno para los experimentos de genotipado se utilizó un segundo método que permite obtener DNA de mayor pureza y calidad (A. Sessions, comunicación personal).

El material del que se partió fue un trozo de hoja de un tamaño 3 veces superior a la tapadera de un tubo de 1,5mL que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Las hojas se machacaron en presencia de nitrógeno líquido con la ayuda de una varilla de

plástico autoclavada. Se dejaron descongelar las muestras y se le añadieron 600mL de tampón de lisis al 1X. A continuación se incubaron las muestras a 37°C en agitación. Transcurrido ese tiempo se añadieron 300mL de fenol/CHCl₃/IsoOH y se sometieron a un nuevo periodo de incubación. Tras centrifugar las muestras se transfirió la fase superior a un tubo nuevo conteniendo 50μL de NaOAc 3M (pH=5) y 550μL de isopropanol y se mezcló homogéneamente. Se centrifugaron las muestras y se decantó el sobrenadante. A continuación se lavó el DNA con etanol al 70% y una vez que se hubo evaporado todo el etanol, el DNA se resuspendió en 40μL de TE.

Soluciones:

1. Tampón de lisis 10X:

		<u>Stock</u>
3.5M NaCL	35mL	5M
10mM Tris (pH=7.6)	250μL	2M
10mM EDTA (pH=8)	1mL	0.5M
dd H ₂ O	13,75mL	

50mL		

2. Tampón de lisis 1X:

		<u>Stock</u>
1X lisis	1mL	10X
50mM EDTA	1mL	0.5M
7M urea	4,2gr	
2% Sarcosyl	0,2gr	

10mL		

5.8.5 Extracción de RNA total de Arabidopsis.

Para la extracción de RNA total se partió, según el caso, de unos 15 ápices inflorescentes en *bolting* o 10 plántulas con una edad de 12 días. La homogeneización se llevó a cabo triturando el tejido previamente congelado con N₂ líquido de la misma forma que en el apartado 5.8.4. Las extracciones se realizaron con el sistema *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente se trataron en su totalidad con DNasa utilizando el *Ambion's DNA free-kit* (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del RNA obtenido se determinó con un *ND-1000 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies).

5.9. Métodos de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

5.9.1. PCR sobre DNA.

Para amplificar fragmentos de DNA, para generar fragmentos para clonación o para genotipado, se utilizó el método de la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* o PCR) (Saiki *et al.*, 1998), utilizando cebadores específicos y como molde DNA de diversa naturaleza incluyendo DNA plasmídico o genómico, fragmentos obtenidos por PCR o cDNA obtenido a partir de la retrotranscripción del RNA.

Para amplificar fragmentos por PCR para su posterior clonación se utilizaron DNA polimerasas termoestables comerciales, concretamente la Pfu turbo DNA Polymerase (Stratagen) que se caracteriza por tener una baja tasa de error y la EcoTaq (Ecogen). Estas enzimas tienen sus propios tampones de reacción que se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

El diseño de los cebadores específicos para cada gen se realizó de forma manual teniendo en cuenta la longitud (entre 16 y 25 nucleótido), contenido de GC superior al 40%, extremos 3' ricos en GC y temperatura de fusión (T_m) similar en cada pareja de cebadores. Los cebadores utilizados fueron sintetizados por Invitrogen o Integrated DNA Technologies. Cuando a los fragmentos amplificados se les querían añadir sitios de restricción las secuencias se añadían a los extremos 5' de los correspondientes cebadores. La información sobre los cebadores se especifica en el anexo I.

Las condiciones generales de PCR utilizadas para la amplificación de DNA han sido:

2µl de DNA molde.

2µl (1-1.25µM) de cada cebador (a una concentración de 20µM).

4µl (1.25 mM) de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido.

0.5µl de Pfu turbo DNA polymerase (STRATAGEN) o

0.25µl de EcoTaq DNA polymerase (ECOGEN).

5µl de tampón de reacción correspondiente.

H₂O hasta un volumen final de 50µl.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research), con las siguientes etapas: 94°C 10 min

94°C 30 seg	}	30/35ciclos
AA°C 45 seg		
72°C B min		
72°C 5 min		
20°C infinito		

AA= temperatura óptima de hibridación de los cebadores, calculada como 4°C por debajo de la menor T^am de la pareja de cebadores, oscila entre 45 y 65°C. La T^am se calcula según la fórmula $[4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)]$.

B= tiempo de extensión, depende de la longitud del fragmento a amplificar (aproximadamente 1min por cada Kb de DNA).

5.9.2. Transcripción reversa (RT).

Para los experimentos de RT-PCR (apartados 5.9.3. y 5.9.4.), se sintetizó cDNA mediante transcripción reversa del RNA. Para ello, se incubaron a 65 °C, durante 10 minutos, 2 µg de RNA, con 3.6 µg de hexámeros aleatorios (*random hexamers* de Roche) y 2 nmol de MgCl₂ en un volumen final de 12 µL. Posteriormente, y hasta completar un volumen de 20 µL, se añadieron 0.5 mmoles de desoxirribonucleótidos, 40 unidades de inhibidor de RNase *Ribolock* (Fermentas) y 40 unidades de retrotranscriptasa *SuperScript II retrotranscriptase* (Invitrogen) con su correspondiente tampón a una concentración final 1X. Esta mezcla se incubó a 42°C durante 50 minutos, seguidos de una desnaturalización a 75°C durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 70 µL de agua a cada reacción y se cuantificó utilizando un *ND-1000 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies). Finalmente, todas las muestras se almacenaron a -20°C, para su posterior uso.

5.9.3. RT-PCR semicuantitativa.

Para la amplificación del producto de la transcripción reversa (cDNA) se utilizaron 2 µL de cDNA como molde de la PCR, obtenido según se describe en el apartado anterior. Las condiciones de la PCR fueron similares a las descritas en este apartado, pero se extrajeron muestras de 2 µL de cada reacción transcurridos 20, 25 y 30 ciclos para estimar las curvas de amplificación.

5.9.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Los experimentos de expresión génica realizados mediante ésta técnica se llevaron a cabo en un aparato *SDS 7500* (Applied Biosystems), utilizando el reactivo *Power SYBR Green* (Applied Biosystems). El diseño de oligonucleótidos, la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Para todas las muestras biológicas se hicieron tres réplicas técnicas de PCR. Como molde, se utilizó en todos los casos 1.2 µg del cDNA sintetizado tal como se describe en el apartado 5.9.1. El procesamiento de los datos se llevó a cabo de la manera siguiente: se realizó inicialmente una qPCR con diferentes diluciones (1/1; 1/5; 1/25 y 1/125) de un cDNA genérico (ápices inflorescentes en bolting de Col silvestre) para cada par de oligonucleótidos que se iban a utilizar, con la finalidad de calcular la eficiencia de los mismos según se describe en (Schmittgen y Livak, 2008), utilizando la expresión $\text{Eficiencia} = 10^{-(1/\text{pendiente})}$. Una vez comprobada que para todos los pares de oligonucleótidos la eficiencia estaba dentro del rango 1.8-2.2, se comenzó a trabajar con las muestras. El gen que se utilizó como referencia para normalizar cantidades fue *UBIQUITINA 10 (UBQ10)* y *TIP41-like* y se utilizó el método de comparación de Ct para calcular las diferencias de expresión entre los pares de condiciones consideradas (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008)

$$2^{-\left[\frac{\text{Ct gen A} - \text{Ct ACT2/8}}{\text{(muestra problema)}} - \frac{\text{Ct gen A} - \text{Ct ACT2/8}}{\text{(muestra control)}} \right]}$$

5.10. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Para la separación de fragmentos de DNA, se utilizaron geles de agarosa con una concentración del 0.6 al 2% (p/v) en tampón TBE (tris-borato EDTA) 1X, según se describe en Sambrook *et al.* (1989). La concentración de agarosa en el gel fue inversamente proporcional al tamaño de las moléculas de DNA a separar, es decir, moléculas grandes se separaron mejor en geles con porcentajes bajos de agarosa y viceversa. Además, los geles contenían 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, lo que permitió

visualizar el DNA tras exponer el gel a luz ultravioleta. Las electroforesis se realizaron en sistemas horizontales “Sub-Cell GT” y “Mini-Sub Cell GT” conectados a una fuente de alimentación “PowerPack™ Basic” de “Bio-Rad” (www.bio-rad.com).

5.11. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa, según se describe en el apartado anterior. Los fragmentos de interés se recortaron del gel con ayuda de una cuchilla y el DNA se purificó con el sistema “QIAquick Gel Extraction Kit” de “QIAGEN”, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema permite la purificación de fragmentos de DNA de 70 pb a 10 kb, aunque fragmentos ligeramente más grandes también se purificaron eficientemente.

5.12. Digestión del DNA con enzimas de restricción.

Para cada enzima se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por la casa comercial. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 1.5 ml, con 5-10 unidades de enzima por µg de DNA, durante al menos 2 horas a la temperatura óptima en cada caso. A continuación, se analizó el resultado de las diferentes reacciones mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa.

5.13 Tratamiento de DNA con enzimas modificadores

5.13.1. Desfosforilación de extremos cohesivos.

Para la desfosforilación de vectores plasmídicos digeridos previamente con enzimas de restricción se añadió al volumen de la digestión el correspondiente volumen del tampón de la fosfatasa para alcanzar una concentración final del 1X y 1u de la enzima fosfatasa alcalina rAPid (Roche) por cada microgramo de vector digerido. La reacción se mantuvo 10 min a 37°C en el caso de que la enzima dejase extremos 5' protuberantes o 30 min a 37°C en caso de que los extremos fueran recesivos. Posteriormente se inactivó la enzima a 75°C durante 2 min.

5.13.2. Clonaje de fragmentos de DNA amplificados por PCR.

Estos fragmentos se clonaron en plásmidos intermedios que permitían su posterior secuenciación, tal como el pGem-Teasy (Promega), o PCR8 (Invitrogen). Para ello se siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

5.13.3 Clonaje de fragmentos de DNA y plásmidos digeridos.

Para la clonación de los fragmentos de interés en los distintos vectores plasmídicos se llevaron a cabo reacciones de ligación con una relación estequiométrica vector: inserto de 1:1, 1:3 o 1:5 con el fin de optimizar la reacción. Para calcular la relación molar existente (1:1) entre un fragmento y vector concreto se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Cantidad de inserto (ng)} = \frac{\text{Cantidad de vector (ng)} \cdot \text{Tamaño del inserto (kB)}}{\text{Tamaño del vector (Kb)}}$$

Las reacciones de ligación se realizaron normalmente en un volumen final de 10 µl conteniendo la cantidad recomendada de vector linearizado y desfosforilado (según el caso) y de inserto, tampón de ligación 1x y 5 U de la T₄ DNA ligasa (Roche o Promega). Las reacciones se mantuvieron a 16 °C durante una noche. Los productos de las reacciones de ligación se emplearon directamente para la transformación bacteriana.

5.13.4. Ligación de fragmentos de DNA mediante la tecnología *Gateway*.

En aquellos casos en los que la ligación de fragmentos de DNA se realizó mediante el sistema *Gateway* (Invitrogen), en lugar del uso de DNA ligasas convencionales, se procedió a una reacción de recombinación *LR* catalizada por la enzima *LR clonase* (Invitrogen) entre un vector de entrada que contenía extremos *attL* y un vector de destino con extremos *attR*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.14 Hibridaciones *in situ* de RNA (RNA ISH).

El procedimiento con el cual fue fijado e incluido el material para la ISH, se describirá en el apartado 5.15.

5.14.1. Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina.

En todos los casos, aproximadamente 2 µg de los plásmidos con el fragmento de cDNA del gen cuyo mRNA se pretendía detectar por ISH se linearizaron con el enzima de restricción apropiado (Tabla 5.8.), dejando un extremo 5' protuberante en el sitio de corte. Los plásmidos así linearizados se utilizaron como molde para la transcripción *in vitro* de sondas de RNA de simple cadena, en sentido y/o antisentido, utilizando las RNA polimerasas indicadas en la Tabla 5.8. Durante la transcripción *in vitro*, las sondas de RNA se marcaron con el ribonucleótido UTP conjugado a una molécula de digoxigenina. Finalmente, estas sondas de RNA se hidrolizaron en tampón carbonato (pH 10.2) a 60 °C durante el tiempo mostrado en la Tabla 5.8 con el fin de obtener un tamaño de sonda medio de unos 300-500 nucleótidos. Todo el proceso de síntesis e hidrólisis de las sondas de RNA se realizó según Coen *et al.* (1990) y Brewer *et al.* (2009). Los plásmidos empleados para la síntesis de las diferentes sondas de RNA se describen en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8. Sondas de RNA utilizadas en las ISH.

Gen	Sonda	Fragmento	Plásmido ^a	Enzima para digestión	Tiempo de hidrólisis
VOZI	antisentido	1-1461	pJA37	Sph I	54 min
	sentido	1-1461	pJA38	Sac I	54 min
TFLI	antisentido	1-500	pD108	Sal I	0 min
	sentido	1-500	pD108	Sph I	0 min

^a Fragmento del cDNA contenido en la sonda, considerando 1 el primer nucleótido del ATG.

5.14.2. Cuantificación de las sondas de RNA.

Las sondas, previamente precipitadas con tRNA de levadura (1 µg/µL, Roche Diagnostics), acetato amónico 0.6 M y etanol absoluto, se centrifugaron a 4°C y 13000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol 70%, se dejó secar al aire y se resuspendió en 10 µL de agua tratada con DEPC. Con 1 µL de cada

una de las sondas, se prepararon las diluciones empleadas en la cuantificación (1/20, 1/250, 1/1.000 y 1/2500) y al resto se le añadieron 91 μL de solución de hibridación, pudiendo conservarse a -80°C hasta el momento de su utilización. A continuación, se aplicó 1 μL de cada una de las diluciones anteriores a una membrana de nailon *Hybond-XL* (Amersham Pharmacia Biotech) que, tras secarse, se irradió con luz UV. El revelado de esta membrana se realizó junto con una tira control con distintas concentraciones de RNA marcado con digoxigenina *RNA Scripts Test* (Roche Diagnostics). Se incubaron conjuntamente la tira control y la membrana con las diluciones de las sondas en TBS 1X (stock preparado a concentración 10X: Tris-HCl 1 M; NaCl 4 M; pH 7.5) durante 2 minutos, y a continuación se incubaron 10 minutos en TBS 1X con agente bloqueante 0.5% (p/v) (Roche Diagnostics). Se transfirieron a una solución de anticuerpo anti-DIG-ab (1/3000, Roche Diagnostics) en TBS 1X durante 15 minutos, tras lo cuales se lavaron 1 minuto en tampón de detección 1X sin sustrato (stock preparado 10X: Tris-HCl 1 M; NaCl 1 M; MgCl₂ 0.5 M; pH 9.5). Por último, se reveló incubando con tampón de detección 1X con sustrato [150 μL de NBT (100 mg/mL) y 150 μL de BCIP (50 mg/mL) por cada 100 mL de tampón; Roche Diagnostics] durante el tiempo suficiente para que se viera el último punto de la tira control.

La concentración de sonda a utilizar en cada caso fue la que más se aproximó al penúltimo punto de la tira control.

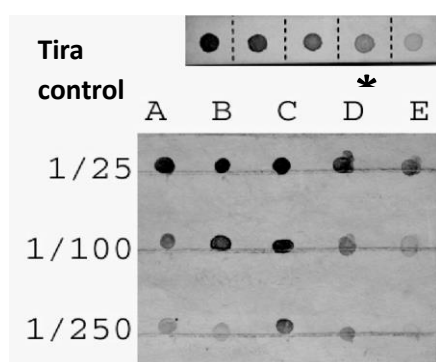


Figura 5.1 Cuantificación simultánea de varias ribosondas (A-E). En la parte superior aparece una tira control que contiene cantidades estandarizadas de RNA marcado con digoxigenina. La concentración de sonda cuya mancha se aproxima al penúltimo punto de la tira (asterisco) era, en principio, la que se utilizaba en la ISH. Imagen tomada de Navarrete- Gómez, 2010.

5.14.3. Prehibridación, hibridación e inmunodetección colorimétrica de la señal.

La preparación de las muestras, hibridación con las sondas de RNA, inmunodetección colorimétrica de la señal, tinción con calcoflúor y montaje de los portaobjetos se realizó según Weigel y Gazelbrook (2002).

En los ensayos realizados, como control positivo, se hibridaron algunas secciones con la sonda RNA antisentido del cDNA de *TFL1*. Asimismo, como control negativo, se hibridaron algunas secciones con las sondas de RNA sentido de los cDNAs de *TFL1* y *VOZI*. La temperatura de hibridación fue, para *TFL1* 53.5° C y para *VOZI* 52.7° C.

5.15. Métodos de histología y microscopía.

5.15.1. Análisis de la actividad GUS.

Las muestras, generalmente ápices vegetativos o inflorescentes, se recogieron con ayuda de unas pinzas, introduciéndolos en un vial con acetona al 90%, para fijar las muestras, durante 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se pasaron a solución de revelado (Tabla 5.9). Tras la infiltración de los ápices con solución de revelado, aplicando vacío durante 5 minutos, se incubaron en esta solución durante toda la noche, según el caso, a 37 °C. Al día siguiente, los ápices se lavaron con concentraciones crecientes de etanol (v/v): etanol al 20%, etanol al 35%, etanol al 50%, FAE (50% etanol absoluto, 10% ácido acético glacial, 5% formaldehído (v/v)) y etanol al 70%. Cada lavado se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez los ápices estaban en etanol al 70% se guardaron a 4 °C.

La solución de revelado que se utilizó en este trabajo (con altas concentraciones de ferro- y ferricianuro) representa unas condiciones de tinción astringente, lo que conlleva una baja actividad de la proteína GUS (Sessions *et al.*, 1999). De este modo, se generan patrones de expresión bien definidos en los que, generalmente, no se observa expansión de la señal a regiones donde el gen GUS no se está expresando. Esta tinción se utilizó para el análisis de los patrones de expresión de *VOZI* y *TFL1*.

Tabla 5.9. Solución de revelado utilizada en la tinción GUS.

	Concentración
Tampón fosfato sódico pH 7.0	50 mM
Ferrocianuro de potasio	10 mM
Ferricianuro de potasio	10 mM
Triton-X-100	0.2 % (v/v)
X-gluc	1 mM

5.15.2. Aclarado con hidrato de cloral para la observación del tejido vegetal.

Para aclarar los tejidos vegetales, ápices de inflorescencia, se trataron con hidrato de cloral siguiendo el protocolo de S. Christensen (Weigel y Glazebrook, 2002).

Las muestras se fijaron en una mezcla de etanol: ácido acético glacial (6:1) a temperatura ambiente durante 24 horas. Se reemplazó la mezcla de etanol: acético por etanol al 100% y se incubaron las muestras 30 min a temperatura ambiente. Este proceso se repitió dos veces. A continuación, se quitó el etanol y se reemplazó con una disolución de hidrato de cloral: hidrato de cloral/ glicerol/ agua (8g/1ml/2ml), en la que se mantuvo durante 48 horas. Para su observación al microscopio, se montaron las muestras en glicerol al 10% sobre portaobjetos en los que se habían colocado 3-4 pegatinas pequeñas aplicadas en cada extremo, de forma que quedara espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos evitando así que las muestras se aplastaran. Para visualizar las muestras aclaradas con hidrato de cloral al microscopio se utilizó la iluminación de campo claro.

5.15.3. Fijación e inclusión de muestras para hibridación in situ de RNA.

Una vez recogidas, las muestras de tejido se sumergieron inmediatamente en solución fijadora FAE (50% etanol absoluto, 5% ácido acético glacial y 3.7% formaldehído (v/v)) en hielo y se infiltraron al vacío durante, aproximadamente, 10 minutos, distribuidos en 2 pulsos de 5 minutos. A continuación, se sustituyó la solución de FAE por solución fresca y se fijaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron 2 veces con etanol al 70% (v/v) a temperatura ambiente y se guardaron, en etanol al 70%, a 4 °C hasta que se inició la inclusión en parafina.

Antes de la inclusión, las muestras se lavaron dos veces con etanol al 90% (v/v) y se tiñeron con eosina al 0.2% (en etanol al 90%, p/v), primero durante 2 horas a temperatura ambiente y, a continuación, toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron lavados, de 1 h 15 min cada uno a temperatura ambiente, en soluciones con concentración creciente de *Histo-Clear™ II* (National Diagnostics), y decreciente de etanol (v/v): 75%etanol:25%Histo-Clear, 50%etanol:50%Histo-Clear y 25%etanol:75%Histo-Clear. A continuación, se realizaron 3 lavados de 45 minutos con Histo-Clear tras los cuales las muestras se incubaron a 60 °C en una solución 50%Histo-Clear:50%parafina (v/v) durante toda la noche. En los dos días siguientes, se realizaron varios cambios de parafina a 60 °C, 2-3 por día. Al tercer día, tras comprobar que los viales con las muestras habían perdido el olor característico a Histo-Clear, se sacaron de la estufa a 60 °C, y las muestras se colocaron en moldes metálicos en la orientación adecuada, sumergidos en parafina y cubiertos con soportes desechables, para la obtención de cortes histológicos en el microtomo. Una vez orientadas las muestras, se dejaron atemperar para que la parafina se solidificase y los bloques se guardaron a 4 °C hasta su uso.

5.15.4. Obtención de cortes histológicos.

Para llevar a cabo la realización de cortes histológicos se utilizaron indistintamente los microtomos *Microm HM-330* y *Leica RM-2025* (Leica). Se realizaron secciones de 8 µm de grosor. Las tiras con los cortes se extendieron en un baño con agua destilada a 42 °C, se colocaron en portaobjetos *FisherBrand ProbeOn Plus Microscope Slides* (Fisher Scientific) y se dejaron secar sobre una placa calefactora a 40 °C durante una noche.

Si los cortes correspondían a muestras teñidas para detectar actividad GUS, se desparafinaron con tres lavados de 3 minutos con Histo-Clear. A continuación, se dejó escurrir un poco el Histo-Clear de los portaobjetos y se distribuyeron tres gotas de resina *Merckoglass*, (Merck), a lo largo de la región central. Al colocar el cubreobjetos, se presionó ligeramente para eliminar el exceso de resina, intentando evitar la formación de burbujas. Este montaje se dejó secando una noche a temperatura ambiente antes de observar los cortes al microscopio óptico.

En el caso de las muestras para hibridación in situ de RNA, el proceso de desparafinado y montaje se realizó según lo descrito en Weigel y Glazebrook (2002).

5.15.5. Fotografía mediante microscopia de bajo aumento.

Para fotografiar tejidos con bajo aumento (5-20X), se utilizó una lupa binocular Nikon modelo SMZ800 provista de una unidad de iluminación externa de luz blanca fría (Volpi Intralux 4000-1) y conectada a una cámara digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1) o una lupa binocular Leica MZ16F, conectada a un ordenador con el software LAS V4.1 de Leica para análisis de imagen.

5.15.6. Microscopia óptica.

Los cortes histológicos y las muestras montadas en portaobjetos fueron observados y fotografiados mediante un microscopio Nikon Eclipse E-600 acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1) y un ordenador con el software de análisis de imagen AnalySIS 3.2 (Soft Imaging System) y NIS-Elements F3.0. Las muestras fueron observadas con iluminación de campo claro, utilizando la técnica Normasky que permite detectar enfocar un plano discreto en una muestra tridimensional.

5.15.7. Microscopía confocal.

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Alemania), consistente en un microscopio invertido DMIR2 y una unidad espectral confocal SL con dos detectores de fluorescencia simultáneos y 4 líneas de láser (458nm, 488nm, 514nm y 534nm). Para excitar la GFP, y la YFP, se utilizó un láser de 488nm, y la emisión se recogió entre 500nm y 520nm (máximo de emisión: 509nm). La clorofila se excitó con el mismo láser, y su emisión se recogió entre 660nm y 690nm. La identidad de la señal se confirmó en todos los casos mediante un barrido de longitudes de onda (λ -scan), para visualizar la intensidad de la emisión a las diferentes longitudes de onda.

5.16. Ensayos que implicaron el uso de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Se utilizó la expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* para llevar a cabo tres tipos de estudios diferentes: para ensayos de BiFC, de activación de Luciferasa y para determinar la localización subcelular de las proteínas VOZ.

5.16.1. Ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC).

Se utilizaron ensayos de BiFC para analizar si dos proteínas de interés interaccionaban físicamente. Para ello, se generaron fusiones traduccionales de las secuencias codificantes de los genes de interés con una de las dos mitades de la proteína YFP (contenidas en los plásmidos pYFC43 e YFN43, descritos en la tabla 5.4; Belda-Palazón et al., 2012 -para más información sobre estos vectores se puede consultar la página web <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>). Como controles positivos se utilizaron los plásmidos YFP^N-SOC1 e YFP^CFUL.

La región codificante del cDNA de los genes de interés se clonó en la región C-terminal de la mitad de la proteína YFP.

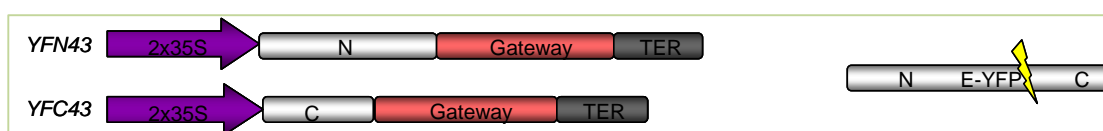


Figura 5.2. Esquema de las construcciones utilizadas para el ensayo de interacción proteína-proteína *in vivo*. Estos plásmidos constan de un doble promotor 35S, la región C-terminal (C) o N-terminal (N) de la proteína YFP, el cassette de Gateway donde se clonó el gen y un terminador. Imagen tomada de Navarrete- Gómez, 2010

Obtenidas estas construcciones e introducidas en la cepa de *A.tumefaciens* C58, se inocularon cultivos, bien con el glicerinado de *A. tumefaciens* directamente o bien con una colonia fresca procedente de placa, en 5mL de medio YEB suplementado con los antibióticos apropiados y se cultivó o/n a 28°C.

Al día siguiente, se transfirió el cultivo a 50 ml de medio de inducción con los correspondientes antibióticos en un matraz de 250 ml y se cultivó o/n a 28°C. Se centrifugaron los cultivos durante 30 min a 3000 rpm. El sedimento se resuspendió en medio de infiltración y se ajustó la absorbancia a 0.5 (medida a una longitud de onda de

600 nm). A continuación, los cultivos se incubaron con agitación suave (30 rpm) o/n a temperatura ambiente.

A la mañana siguiente se realizaron las correspondientes mezclas de cultivos (en caso de co-transformación) y con la ayuda de jeringuillas de 5ml se infiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* por el envés de la misma. Se eligieron hojas jóvenes (normalmente la 3ª y 4ª hoja). Las hojas se observaron al microscopio confocal transcurridos 2-3 días.

Medios de cultivo:

Medio YEB:

0.5% Extracto de hueso.

0.1% Extracto de levadura.

0.5% Peptona.

0.5% Sacarosa.

pH 7.4

Tras ser autoclavado se le añade MgSO_4 2mM filtrado.

Medio de inducción:

0.5% Extracto de hueso.

0.1% Extracto de levadura.

0.5% Peptona.

0.5% Sacarosa.

10mM MES pH 5.6

Y tras ser autoclavado se le añade:

2mM MgSO_4 *.

20µM acetosiringona *.

Medio de infiltración:

10mM MgCl_2 (filtrado).

10mM MES pH 5.6 (autoclavado).

200µM acetosiringona *.

* Esterilizados por filtración.

5.16.2. Ensayos de activación de la Luciferasa.

Con estos ensayos se estudia la posible respuesta de regiones promotoras específicas a la actividad de factores de transcripción de nuestro interés. Para ello, se generan construcciones en las que la expresión de la región codificante del gen de la Luciferasa esté dirigida por la región promotora en estudio. Mediante expresión transitoria de esta construcción deladora y de los factores de transcripción de interés puede detectarse

la respuesta del promotor a dichos factores. Para normalizar la variabilidad de los niveles de expresión en cada muestra, la construcción promotor-LUC también contiene una unidad transcripcional 35S::Renila, cuya actividad se utiliza como patrón de referencia interno. De cada muestra

Para la infiltración de las hojas con las construcciones necesarias, se siguió el mismo protocolo que en el ensayo de BiFC.

Transcurridos tres días desde la infiltración, se recogieron discos de hoja de 2 cm de diámetro que se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido, en una placa de 96 pocillos de 2 cm de profundidad. A continuación, se machacaron las muestras y se les añadió 750 µl del tampón de lisis al 1X (Promega). Se transfirieron 50 µl de cada extracto a una placa blanca y opaca de 96 pocillos (Greiner Microton, BIORAD) y, posteriormente, se le añadió 40 µl del reactivo Dual-Glow™ Luciferasa (Promega). Se agitó la placa durante 10 seg y, transcurridos 10 min, se cuantificó en el luminómetro la luminiscencia emitida por la Luciferasa durante 10 seg. Para parar la primera reacción e iniciar la segunda, se añadieron 40 µl del reactivo Dual-Glow™ STOP & GLOW (Promega) a una dilución 1/100 en el tampón correspondiente. Se agitó durante 10 seg y a continuación, la placa se dejó 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se volvió a cuantificar la luminiscencia, pero en este caso emitida por la Renila, durante 10 seg. Para cuantificar la luminiscencia se utilizó un luminómetro (GlowMax™ 96 Microplate Luminometer con dos inyectores).

5.16.3. Localización subcelular de las proteínas VOZ en *Nicotiana benthamiana*.

Para determinar la localización subcelular de las proteínas VOZ en *Nicotiana benthamiana* se generaron construcciones en las que se fusionaba la proteína fluorescentes YFP o GFP a las proteínas VOZ1 y VOZ2, en el extremo amino terminal o en el carboxilo terminal; en ambos casos dirigidas por el promotor constitutivo 35S. La infiltración en *Nicotiana benthamiana* se realizó tal como se ha descrito para los ensayos de BiFC (apartado 5.16.1.). Transcurridos 2-3 días tras la infiltración, las células de la epidermis de las hojas se observaron al microscopio confocal.

5.17. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Los ensayos de ChIP se realizaron, bien con la parte aérea de plántulas de 15 días, o con ápices de inflorescencias en *bolting*. En ambos casos, las plantas se cultivaron en un fitotrón, en día largo, y las muestras se tomaron 3 horas tras el encendido de las luces. Se utilizaron plantas 35S::YFP-VOZ1 y, como control, plantas 35S::VOZ1. Para los experimentos de ChIP siguió el protocolo descrito por Sorefan *et al.* (2009), utilizando un anticuerpo frente a GFP (Ab290, Abcam).

5.17.1. Entrecruzamiento.

Se recolectaron muestras de 700mg de tejido que, tras ser lavadas con agua, se sumergieron inmediatamente en 20 ml de solución A (solución de entrecruzamiento: 0.4M sacarosa, 10mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF y 1% formaldehído (el PMSF y el formaldehído se añaden en el momento de utilizar la solución) en un tubo Falcon de 50ml, y se les aplicaron 2 pulsos de vacío de 5 y 10 minutos. Con este paso se consigue el entrecruzamiento de las proteínas al DNA al que están asociadas.

Para detener la reacción de entrecruzamiento se añadió 1 ml de glicina 2M, aplicando vacío durante 10 minutos más.

Tras detener la reacción de entrecruzamiento se lavó el tejido con agua destilada (unos 5 enjuagues), se eliminó el exceso de agua secando con un poco de papel absorbente y se volvieron a pesar las muestras, antes de congelarlas en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C, aunque evitando periodos de almacenamiento prolongados.

5.17.2. Preparación de las “beads”.

Este paso se llevó a cabo el mismo día que se realizó la inmunoprecipitación (IP). Se utilizaron *beads* magnéticas (Protein A magnetic beads, New England BioLabs, S1425S), que facilitan en gran medida los lavados y recuperación del anticuerpo utilizado, mediante el uso de un soporte imantado. Se utilizaron 25µl de *beads* en cada prelavado de las muestras y de 30 a 50 µl por IP (15 µl por cada 100 µl de extracto).

Una vez calculado el volumen necesario de *beads*, se lavaron éstas 3 veces con solución B (50 mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deoxycholato sódico, 0.1% SDS, 10mM butirato sódico, 1mM PMSF, 1mg/ml BSA y

20ng/ml de DNA de esperma de salmón sonicado) en el mismo volumen inicial de las *beads*. En cada lavado las *beads* se incubaron al menos durante una hora con agitación a temperatura ambiente.

Por último se lavaron una vez con la solución de lisis (50 mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deaxycholato sódico, 0.1% SDS, 10mM butirato sódico, 1mM PMSF y 1X del cocktail inhibidor de proteinasas para plantas (Sigma, P9599) (el PMSF y el cocktail se añaden en el momento de utilizar la solución) y luego se resuspendieron en el volumen inicial de las *beads*.

5.17.3. Extracción y sonicación del DNA.

Las muestras entrecruzadas se machacaron en nitrógeno líquido minuciosamente y se resuspendieron en 150 µl de solución de lisis por cada 100 mg de tejido (1050 µl en nuestro caso), obteniéndose una papilla densa, que se transfirió a un tubo eppendorf de 2ml. Las muestras se sometieron a sonicación para fragmentar el DNA cromosómico aproximadamente en fragmentos de entre 100 y 1000 pares de bases utilizando un sonicador UP200S Hielscher Ultrasonics GmbH, con una amplitud del 70% y 70 ciclos/seg. Se realizaron tres sonicaciones de 20 pulsos, manteniendo las muestras siempre en hielo y dejando pasar 2 minutos entre cada sonicación.

Tras haber sonificado se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a máxima velocidad y a 4°C en una centrifuga de mesa.

El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se realizó el prelavado de cada muestra con 25µl de las *beads* preparadas anteriormente, al menos durante una hora con rotación a 4°C.

5.17.4. Inmunoprecipitación.

Tras el prelavado con las *beads* se transfirieron volúmenes fijos, normalmente 150-300 µl, a tubos nuevos que contenían el anticuerpo. En nuestro caso se transfirieron 300 µl de las muestras 35S::VOZ1 (control negativo) y 35S::VOZ1:GFP a tubos que contenían 15 µl de anticuerpo anti-GFP. También se transfirieron 300 µl de cada muestra a tubos sin anticuerpo, que constituirían nuestro “control sin anticuerpo”. De cada muestra se

reservó un volumen superior a 30 µl que después se utilizó como fracción del material de partida o INPUT.

Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con rotación.

Al día siguiente se añadieron 15 µl por cada 100 µl de extracto utilizado, en nuestro caso 45 µl, y se continuó la incubación durante al menos dos horas más.

5.17.5. Lavados.

Los lavados se realizaron en una cámara fría (4°C) utilizando el soporte imantado, y descartando el sobrenadante en cada paso. Cada lavado se realizo con un volumen de 800 µl:

- lavado breve con solución de lisis (invirtiendo el tubo 7-8 veces hasta resuspender las beads).

- lavado largo con solución de lisis (5 minutos de incubación con rotación).

- lavado breve con solución LNDET (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P40, 1% deoxicholato sódico y 1mM EDTA).

- lavado largo con solución LNDET

- lavado breve con TE (10mM Tris, pH 8, 1mM EDTA)

- lavado largo con TE

5.17.6. Elución.

A las *beads* obtenidas se le añadieron 40 µl de solución de elución (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃ y 0.25 mg/ml de proteinasa K) y se incubaron a 65°C durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y se repitió dos veces la elución de las beads con 40 µl más de solución de elución. Finalmente se obtuvo un volumen de elución de 80 µl.

De la fracción del material de partida que habíamos reservado se tomaron 30 µl y se añadieron a 50 µl de solución de elución. Esto correspondía a un 10% del material de partida utilizado en la IP.

5.17.7. Reversión del entrecruzamiento.

Para revertir el entrecruzamiento, todas las muestras se incubaron durante toda la noche a 65°C, dentro de un termociclador.

El DNA se recuperó al día siguiente usando el Kit comercial PCR purification kit (QUIAGEN), eluyendo en un volumen final de 50 µl. En nuestro caso el volumen final se diluyó a la mitad, aunque este paso depende de la cantidad de DNA recuperado.

Es aconsejable testar la calidad de la sonicación en la fracción del INPUT después de la purificación mediante el kit de QUIAGEN, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

La determinación del grado de enriquecimiento en secuencias de nuestras muestras se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Una vez obtenidos los valores relativos se normalizaron los resultados obtenidos entre las muestras de partida o INPUT y las muestras inmunoprecipitadas o IP. Posteriormente se calculó la relación existente entre la IP y el INPUT estableciendo de esta manera el grado de enriquecimiento. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos para la región de 2.8 -3.2 kb del promotor de *TFL1* hacia el extremo 3' fueron diseñados mediante el programa primer express 2.0 utilizando los parámetros por defecto, que incluye entre otros, T^a m entre 58-60 °C, contenido en GC 30-80 % y amplicones entre 50-150 pb.

5.18. Ensayos de híbrido simple en levadura.

Con el fin de delimitar la región donde se une la proteína VOZ1 al promotor de *TFL1* se realizaron ensayos de híbrido simple.

En primer lugar se procedió a transformar la cepa de levadura PJ69-4α (apartado 5.7.2), con los plásmidos cebo pJA38 - 42, que contienen el fragmento 2.8-2.3 de la región 3' de *TFL1* (Fcomp., 418 pb) y las diferentes delecciones del mismo (F1 a F4) (Tabla 5.4), linearizados con la enzima AflII, para permitir su integración en el genoma de la levadura. Entre los transformantes, seleccionadas en medio SD sin histidina ni uracilo (SD-H-U), se escogieron cuatro colonias para cada construcción y se sembraron en medio sólido SD-H-U con concentraciones crecientes del inhibidor de la síntesis de histidina 3-amino-trizol (3-AT). Para cada construcción se seleccionaron las dos colonias cuyo crecimiento era inhibido por concentraciones más bajas de 3-AT (Fcomp., 20 mM; F1, 5 mM; F2, 70 mM,

F3, 10mM; F4, 20 mM). Una vez determinadas las concentraciones óptimas de 3AT los dos clones de cada fragmento se transformaron con el plásmido presa pJA29 (con el CDS de *VOZI* subclonado en el vector de levaduras pGADT7rec; Tabla 5.4), según el protocolo descrito en el apartado 5.7.3, seleccionando los transformantes en medio SD menos histidina uracilo y leucina. Asimismo, como control negativo los clones con las distintas delecciones también se transformaron con el vector pGADT7re vacío. Finalmente, se ensayó la capacidad de las levaduras transformadas con las diferentes combinaciones de plásmido cebo-plásmido presa de crecer en placas de medio sólido selectivo y en ausencia o presencia de la correspondiente concentración de 3-AT.

6-BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. y Araki, T.** (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*. **309**, 1052-1056.
- Ahn, J. H., Miller, D., Winter, V. J., Banfield, M. J., Lee, J. H., Yoo, S. Y., Henz, S. R., Brady, R. L. y Weigel, D.** (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J.* **25**, 605-614.
- Alvarez, J., Guli, C. L., Yu, X. H. y Smyth, D. R.** (1992). *terminal flower* : a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2**, 103-116.
- Amasino, R.** (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant Journal* **61**: 1001–1013.
- An, H., Roussot, C., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Piñeiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C. y Coupland, G.** (2004). *CONSTANS* acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development*. **131**, 3615-3626
- Aukerman, M. J. y Sakai H.** (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*. **15**, 2730-2741.
- Aukerman, M. J., Lee, I., Weigel, D. y Amasino, R. M.** (1999). The *Arabidopsis* flowering-time gene *LUMINDEPENDENS* is expressed primarily in regions of cell proliferation and encodes a nuclear protein that regulates *LEAFY* expression. *Plant J.* **18**, 195-203.
- Ausín, I., Alonso-Blanco, C., Jarillo, JA., Ruiz-García, L., Martínez-Zapater, JM.** (2004). Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nature Genetic*. **32**, 162-166.
- Balanzà, V.** (2011). Nuevas funciones y dianas moleculares del factor de transcripción FRUITFULL en *Arabidopsis Thaliana*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.
- Banfield, M.J., and Brady, R.L.** (2000). The structure of Antirrhinum centroradialis protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator. *Journal of Molecular Biology* **297**: 1159–1170.

- Bastow, R., Mylne, J. S., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R. A. y Dean, C.** (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. *Nature*. **427**, 164-167.
- Bäurle, I. y Dean, C.** (2008). Differential interactions of the autonomous pathway RRM proteins and chromatin regulators in the silencing of Arabidopsis targets. *PloS ONE*. **3**, e2733.
- Bäurle, I., Smith, L., Baulcombe, D. C. y Dean, C.** (2007). Widespread role for the flowering-time regulators FCA and FPA in RNA-mediated chromatin silencing. *Science*. **318**, 109-112.
- Bechtold, N., Ellis, J. y Pelletier, G.** (1993). *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* **316**, 1194-1199.
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A.F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P., y Ferrando, A.** (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PloS One*. **10**, 46907.
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A. y Madueño, F.** (2007). Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. *Ann. Bot.* **100**, 659-676
- Benlloch, R., Chul, M., Sayou, C., The veron, E., Parcy, F. y Nilsson O.** (2011). Integrating long-day flowering signals: a LEAFY binding site is essential for proper photoperiodic activation of APETALA1. *Plant Journal*. **67**(6):1094-102.
- Berendzen, K., Searle, I., Ravenscroft, D., Koncz, C., Batschauer, A., Coupland, G., Somssich, I.E y Ulker, B.** (2005). A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods*. **1**,4.
- Blázquez, M. A. y Weigel, D.** (2000). Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. *Nature*. **404**, 889-892.

- Blázquez, M. A., Ahn, J. H. y Weigel, D.** (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* **33**, 168-171.
- Blázquez, M. A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M. R. y Weigel, D.** (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell.* **10**, 791-800.
- Bowman, J. L.** (1994). *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*. Springer-Verlag. New York
- Bowman, J. L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E. M. y Smyth, D. R.** (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development.* **119**, 721-743.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. y Meyerowitz, E. M.** (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **1**, 37-52.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. y Meyerowitz, E. M.** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development.* **112**, 1-20.
- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R. y Coen, E.** (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science.* **275**, 80-83.
- Brewer, P.B., Dun, E., Ferguson, B., Rameau, C., and Beveridge, C.A.** (2009). Strigolactone acts Downstream of Auxin to Regulate Bud Outgrowth in Pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*.
- Busch, M. A., Bomblies, K. y Weigel, D.** (1999). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science.* **285**, 585-587.
- Castillejo, C. y Pelaz, S.** (2008). The balance between *CONSTANS* and *TEMPRANILLO* activities determines *FT* expression to trigger flowering. *Curr. Biol.* **18**, 1338-1443.
- Chae, E., Tan Q. K.-G., Hill, T. A. e Irish, V. F.** (2008). An *Arabidopsis* F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development.* **135**, 1235-1245.

- Chen, L.** (1999). Combinatorial gene regulation by eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Struct Biol.* **1**, 48-55.
- Cho, S., Jang, S., Chae, S., Chung, KM., Moon, YH., An, G. y Jang, SK.** (1999). Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* *APETALA1* as a transcription activation domain. *Plant Mol Biol.* **40**, 419–429.
- Clough, S. J. y Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Coen, E.S., Romero, J.M., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G., and Carpenter, R.** (1990). *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *antirrhinum majus*. *Cell* **63**: 1311–1322.
- Conti, L. y Bradley, D.** (2007). TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *Plant Cell.* **19**, 767-778.
- Conti, L., and Bradley, D.J.** (2007). TERMINAL FLOWER1 is a Mobile Signal Controlling *Arabidopsis* Architecture. *Plant Cell* **19**: 767–778.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. y Coupland G.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science.* **316**, 1030-1033.
- Czechowski, T., Bari, RP., Stitt, M., Scheible, WR., Udvardi, MK.** (2004). Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *P.journal.* **2**, 366-79.
- D'Aloia, M., Bonhomme, D., Bouché, F., Tamseddak, K., Ormenes, S., Torti, S., Coupland, G. y Périlleux C.** (2011). Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. **6**, 972-973.
- Drews, G. N., Bowman, J. L. y Meyerowitz, E. M.** (1991). Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell.* **65**, 991-1002.
- Fernandez –Nohales, P.** (2011). Papel de TERMINAL FLOWER 1 en el control de la arquitectura vegetal. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.

- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. y Yanofsky, M. F.** (2000a). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development*. **127**, 725-734.
- Galvão, V., Horrer, D., Küttner, F. y Schmid, M.** (2012). Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. **21**, 4072-82.
- Germann, S., Juul-Jensen, T., Letarnec, B. y Gaudin, V.** (2006). DamID, a new tool for studying plant chromatin profiling *in vivo*, and its use to identify putative LHP1 target loci. *Plant J.* **48**, 153-163.
- Granovsky, A. E. y Rosner, M. R.** (2008). Raf kinase inhibitory protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Res.* **18**, 452-457.
- Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L. y Kater, M. M.** (2006). *AGL24*, *SHORT VEGETATIVE PHASE* and *APETALA1* redundantly control *AGAMOUS* during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **18**, 1373-1382.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S. J., Gong, F., Phillips, A. L., Hedden, P., Sun, T.-P. y Thomas, S. G.** (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **18**, 3399-3414.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M. F. y Martienssen, R.** (1998). The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*. **125**, 1509-1517.
- Gustafson-Brown, C., Savidge, B. y Yanofsky, M. F.** (1994). Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell*. **76**, 131-143.
- Hanano, S. y Goto, K.** *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *Plant Cell*. **9** :3172-84
- Hanzawa, Y., Money, T. y Bradley, D.** (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 7748-7753.

Hartmann, U., Höhmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H. y Huijser, P. (2000). Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* **21**, 351-360.

Hellens, R., Allan, A., Friel, E., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M., Karunairetnam, S., Gleave, A., Laing, W. (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods.* **1**, 13.

Helliwell, C. A., Wood, C. C., Robertson, M., Peacock, W. J. y Dennis, E. S. (2006). The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant J.* **46**, 183-192.

Hepworth, S. R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A. y Coupland, G. (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J.* **21**, 4327-4337.

Hepworth, S. R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A. y Coupland, G. (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J.* **21**, 4327-4337.

Hewitt, Y. M. (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Farnham Royal, Bucks. Commonwealth Agricultural Bureaux.

Hisamatsu, T. y King, R. W. (2008). The nature of flowering signals in *Arabidopsis* II. Roles for *FLOWERING LOCUS T (FT)* and gibberellin. *J. Exp. Bot.* **59**, 3821-3829.

Hong, R. L., Hamaguchi, L., Busch, M. A. y Weigel, D. (2003). Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *Plant Cell.* **15**, 1296-1309.

Honma, T. y Goto, K. (2000). The *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA* is regulated by discrete *cis*-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development.* **127**, 2021-2030.

- Immink, R.G., Ferrario, S., Busscher-Lange, J., Kooiker, M., Busscher, M. y Angenent G.C.** (2003). Analysis of the petunia MADS-box transcription factor family. *Mol Genet Genomics* **5**, 598-606.
- Irish, V. F. y Sussex, I. M.** (1990). Function of the *apetala-1* gene during Arabidopsis floral development. *Plant Cell*. **2**, 741-753.
- Irish, V.F.** (2010). The flowering of Arabidopsis flower development. *Plant Journal* **61**: 1014–1028.
- Jaeger, K. E. y Wigge, P. A.** (2007). FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **17**, 1050-1054.
- Jansen, M., Kjaersgaard, T., Nielsen, M., Galberg, P., Pettersen, K., O'shea, C. y Skriver, K.** (2010). *Bj Plant*. **426**, 183–196.
- Jiang, D., Gu, X. y He, Y.** (2009). Establishment of the winter-annual growth habit via FRIGIDA-mediated histone methylation at *FLOWERING LOCUS C* in Arabidopsis. *Plant Cell*. **21**, 1733-1746.
- Jofuku, K. D., den Boer, B. G. W., Van Montagu, M. y Okamuro, J. K.** (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*. **6**, 1211-1225.
- Jofuku, K. D., den Boer, B. G. W., Van Montagu, M. y Okamuro, J. K.** (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*. **6**, 1211-1225.
- Jofuku, K. D., Omidyar P. K., Gee Z. y Okamuro J. K.** (2005). Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 3117-3122.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S. D., Amasino R. M. y Dean C.** (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science*. **290**, 344-347.
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Christensen, S. K., Nguyen, J. T., Chory, J., Harrison, M. J. y Weigel, D.** (1999). Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science*. **286**, 1962-1965.

- Kaufmann, K., Wellmer, F., Muiño, J. M., Ferrier, T., Wuest, S. E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueño, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E. M., Angenent, G. C. y Riechmann, J. L.** (2010). Orchestration of floral initiation by *APETALA1*. *Science*. **328**, 85-89.
- Kempin S. A., Savidge B. y Yanofsky M. F.** (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science*. **267**, 522-525.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. y Araki, T.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*. **286**, 1960-1962.
- Koornneef, M., Hanhart, C. J. y van der Veen, J. H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 57-66.
- Kotake, T., Takada, S., Nakahigashi, K., Ohto, M. y Goto, K.** (2003). *Arabidopsis TERMINAL FLOWER 2* gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and represses both *FLOWERING LOCUS T* to regulate flowering time and several floral homeotic genes. *Plant Cell Physiol.* **44**, 555-564.
- Lamb, R. S., Hill, T. A., Tan, Q. K.-G. e Irish V. F.** (2002). Regulation of *APETALA3* floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development*. **129**, 2079-2086.
- Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H., Kim, S.-G., Lee, J. S., Kwon, Y. M. y Lee, I.** (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* **14**, 2366-2376.
- Lee, I., Wolfe, D. S., Nilsson, O. y Weigel, D.** (1997). A *LEAFY* co-regulator encoded by *UNUSUAL FLORAL ORGANS*. *Curr. Biol.* **7**, 95-104.
- Lee, J. H., Yoo, S. J., Park, S. H., Hwang, I., Lee, J. S. y Ahn, J. H.** (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* **21**, 397-402.
- Lee, J., Oh, M., Park, H. y Lee, I.** (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *Plant J.* **55**, 832-843.

- Lenhard, M., Bohnert, A., Jürgens, G. y Laux, T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell*. **105**, 805-814.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E. M. y Yu, H.** (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Dev. Cell*. **15**, 110-120.
- Liljegren, S. J. Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G. S. y Yanofsky, M. F.** (1999). Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *Plant Cell*. **11**, 1007-1018.
- Litt, A.** (2007). An Evaluation of A-FUNCTION: EVIDENCE FROM THE *APETALA1* AND *APETALA2* GENE LINEAGES. *Int. J. Plant Sci.* **168**, 73-91
- Liu C., Xi, W. Y., Shen, L. S., Tan, C. P. y Yu, H.** (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Dev. Cell*. **16**, 711-722.
- Liu, C., Chen, H., Er, H. L., Soo, H. M., Kumar, P. P., Han, J.-H., Liou, Y. C. y Yu, H.** (2008). Direct interaction of *AGL24* and *SOC1* integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development*. **135**, 1481-1491.
- Liu, C., Zhou, J., Bracha-Drori, K., Yalovsky, S., Ito, T. y Yu, H.** (2007). Specification of Arabidopsis floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development*. **134**, 1901-1910
- Liu, C., Zhou, J., Bracha-Drori, K., Yalovsky, S., Ito, T. y Yu, H.** (2007). Specification of Arabidopsis floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development*. **134**, 1901-1910.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Methods **25**: 402-408.
- Lohmann, J. U., Hong, R. L., Hobe, M., Busch, M. A., Parcy, F., Simon, R. y Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell*. **105**, 793-803.

- Maizel, A., Busch, M. A., Tanahashi, T., Perkovic, J., Kato, M., Hasebe, M. y Weigel, D.** (2005). The floral regulator *LEAFY* evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science*. **308**, 260-263.
- Mandel M. A., Gustafson-Brown C., Savidge B. y Yanofsky, M. F.** (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature*. **360**, 273-277.
- Mandel, M. A. y Yanofsky, M. F.** (1995). The *Arabidopsis* *AGL8* MADS box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by *APETALA1*. *Plant Cell*. **7**, 1763-1771.
- Martín-Trillo, M., and Cubas, P.** (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science* **15**: 31–39.
- Masiero, S., Li, M.-A., Will, I., Hartmann, U., Saedler, H., Huijser, P., Schwarz-Sommer, Z. y Sommer, H.** (2004). *INCOMPOSITA*: a MADS-box gene controlling prophyll development and floral meristem identity in *Antirrhinum*. *Development*. **131**, 5981-5990.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F. y Schmid, M.** (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Curr. Biol*. **17**, 1055-1060.
- Mathieu, J., Yant, L. F., Mürdter, F., Küttner, F. y Schmid, M.** (2009). Repression of flowering by the miR172 target *SMZ*. *PloS Biol*. **7**, e1000148.
- Melzer, S., Lens, F., Gennen, J., Vanneste, S., Rohde, A. y Beeckman, T.** (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet*. **40**, 1489-1492.
- Meyerowitz, E. M. y Somerville, C. R.** (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Michaels, S. D. y Amasino, R. M.** (1999). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*. **11**, 949-956.
- Michaels, S. D. y Amasino, R. M.** (2010). The Timing of flowering. *Plant Physiology*. **154**, 516-520.

Michaels, S. D., He, Y., Scortecci, K. C. y Amasino, R. M. (2003). Attenuation of FLOWERING LOCUS C activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behaviour in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 10102-10107.

Michaels, S. D., Himmelblau, E., Kim, S. Y., Schomburg, F. M. y Amasino, R. M. (2005). Integration of flowering signals in winter-annual Arabidopsis. *Plant Physiol.* **137**, 149-156.

Mimida, M., Goto, K., Kobayashi, Y., Araki, T., Ahn, J. H., Weigel, D., Murata, M., Motoyoshi, F. y Sakamoto, W. (2001). Functional divergence of the *TFL1*-like gene family in Arabidopsis revealed by characterization of a novel homologue. *Genes Cells*. **6**, 327-336.

Mimida, N., Kidou, S, Iwanami. H-, Moriya, S., Abe, K., Voogd, C., Varkonyi-Gasic, E, y Kotoda N. (2011). Apple FLOWERING LOCUS T proteins interact with transcription factors implicated in cell growth and organ development. *Tree Physiol.***5**, 555-566.

Mitsuda, N., Hisabori, T., Takeyasu, K., and Sato, M.H. (2004). VOZ; isolation and characterization of novel vascular plant transcription factors with a one-zinc finger from Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiology* **45**: 845- 854.

Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K.-R., Hong, C. B., Paek, N.-C., Kim, S.-G. y Lee, I. (2003). The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J.* **35**, 613-623.

Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K.-R., Hong, C. B., Paek, N.-C., Kim, S.-G. y Lee, I. (2003). The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J.* **35**, 613-623

Moyroud, E., Minguet, EG., Ott F, Yant, L., Posé, D., Monniaux, M., Blanchet, S., Bastien, O., Thévenon, E., Weigel D., Schmid. M y Parcy, F. (2011). Prediction of regulatory interactions from genome sequences using a biophysical model for the Arabidopsis LEAFY transcription factor. *Plant Cell*. **4**:1293-306.

Muttasa-Göttgens, E. y Hedden, P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J. Exp. Bot.* **60**, 1979-1989.

- Mylne, J. S., Barrett, L., Tessadori, F., Mesnage, S., Johnson, L., Bernatavichute, Y. V., Jacobsen, S. E., Fransz, P. y Dean, C.** (2006). *LHP1*, the Arabidopsis homologue of *HETEROCHROMATIN PROTEIN1*, is required for epigenetic silencing of *FLC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 5012-5017.
- Nakai, Y., Fujiwara, S., Kubo, Y. y Sato, MH.** (2013). Overexpression of VOZ2 confers biotic stress tolerance but decreases abiotic stress resistance in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.* **8**;8(3)
- Nakai, Y., Nakahira, Y., Sumida, H., Takebayashi, K., Nagasawa, Y., Yamasaki, K., Akiyama, M., Ohme-Takagi, M., Fujiwara, S., Shiina, T., Mitsuda, N., Fukusaki, E., Kubo, Y. y Sato, MH.** (2013). Vascular plant one-zinc-finger protein 1/2 transcription factors regulate abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. *Plant J.* **5**, 761-75.
- Nilsson, O., Lee, I., Blázquez, M. A. y Weigel, D.** (1998). Flowering-time genes modulate the response to *LEAFY* activity. *Genetics*. **150**, 403-410.
- Odell, J.T., Nagy, F., and Chua, N.H.** (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**: 810–812.
- Ohto, M. A., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., Nakamura, K. y Harada, J. J.** (2005). Control of seed mass by *APETALA2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 3123-3128.
- Okamuro, J. K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M. y Jofuku, K. D.** (1997a). The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 7076-7081.
- Okamuro, J. K., Szeto, W., Lotys-Prass, C. y Jofuku, K. D.** (1997b). Photo and hormonal control of meristem identity in the Arabidopsis flower mutants *apetala2* and *apetala1*. *Plant Cell*. **9**, 37-47
- Olsen, A., Ernst, H., Leggio, y Skriver, K.** (2005). DNA- binding specificity and molecular functions of NAC transcription factors. *Plant Science*. **169**, 785-797.
- Onouchi, H., Igeño, M. I., Périlleux, C., Graves, K. y Coupland, G.** (2000). Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. *Plant Cell*. **12**, 885-900.

- Osnato M, Castillejo C, Matías-Hernández L, Pelaz S. (2012).** TEMPRANILLO genes link photoperiod and gibberellin pathways to control flowering in Arabidopsis. *Nature Communication*. **1**,3:808.
- Parcy, F., Bomblies, K. y Weigel, D. (2002).** Interaction of *LEAFY*, *AGAMOUS* and *TERMINAL FLOWER1* in maintaining floral meristem identity in Arabidopsis. *Development*. **129**, 2519-2527.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M. A., Lee, I. y Weigel, D. (1998).** A genetic framework for floral patterning. *Nature*. **395**, 561-566.
- Piñeiro, M., Gómez-Mena, C., Schaffer, R., Martínez-Zapater, J. M. y Coupland, G. (2003).** EARLY BOLTING IN SHORT DAYS is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in Arabidopsis by repressing *FT*. *Plant Cell*. **15**, 1552-1562.
- Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N., and Lifschitz, E. (2001).** Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell*. **13**: 2687–2702.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. y Coupland, G. (1995).** The *CONSTANS* gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*. **80**, 847-857.
- Ratcliffe, O. J., Amaya, I., Vincent, C. A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E. S. y Bradley, D. J. (1998).** A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*. **125**, 1609-1615.
- Ratcliffe, O. J., Bradley, D. J. y Coen, E. S. (1999).** Separation of shoot and floral identity in Arabidopsis. *Development*. **126**, 1109-1120.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F. y Coupland, G. (2000).** Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science*. **288**, 1613-1616.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D. y Lohmann, J. U.** (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* **37**, 501-506.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J.** (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**: 1101–1108.
- Schultz, E. A. y Haughn, G. W.** (1991). *LEAFY*, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **3**, 771-781.
- Schultz, E. A. y Haughn, G. W.** (1993). Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. *Development*. **119**, 745-765.
- Schultz, E. A. y Haughn, G. W.** (1993). Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. *Development*. **119**, 745-765.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R. A. y Coupland, G.** (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* **20**, 898-912.
- Serrano-Mislata, A.** (2010). Análisis de la regulación transcripcional del gen TERMINAL FLOWER 1 de *Arabidopsis*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.
- Sessions, A., Weigel, D., and Yanofsky, M.F.** (1999). The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant Journal* **20**: 259–263.
- Shannon, S. y Meeks-Wagner, D. R.** (1991). A mutation in the *Arabidopsis TFL1* gene affects inflorescence meristem development. *Plant Cell*. **3**, 877-892.
- Sheldon, C. C., Burn, J. E., Perez, P. P., Metzger, J., Edwards, J. A., Peacock, W. J. y Dennis, E. S.** (1999). The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*. **11**, 445-458.
- Simon, R., Igeño, M. I. y Coupland, G.** (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature*. **384**, 59-62.

- Smyth, D. R., Bowman, J. L. y Meyerowitz, E. M.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **2**, 755-767
- Sohn, E. J., Rojas-Pierce, M., Pan, S., Carter, C., Serrano-Mislata, A., Madueño, F., Rojo, E., Surpin, M. y Raikhel, N. V.** (2007). The shoot meristem identity gene *TFL1* is involved in flower development and trafficking to the protein storage vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 18801-18806.
- Sorefan, K., Girin, T., Liljegren, S.J., Ljung, K., Robles, P., Galván-Ampudia, C.S., Offringa, R., Friml, J., Yanofsky, M.F. y Østergaard, L.** (2009). A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*. **7246**:583- 586.
- Srikanth, A., Schmid, M.** (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **68**:2013–2037
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. y Coupland, G.** (2001). *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*. **410**, 1116-1120
- Sun, T., Goodman, H., Ausubel, F.** (1992). Cloning the *Arabidopsis* GA1 Locus by Genomic Subtraction. *Plant Cell*. **2**, 119-128.
- Sung, S. y Amasino, R. M.** (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature*. **427**, 159-164.
- Sung, S., He, Y., Eshoo, T. W., Tamada, Y., Johnson, L., Nakahigashi, K., Goto, K., Jacobsen, S. E. y Amasino, R. M.** (2006). Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat. Genet.* **38**, 706-710.
- Takada, S. y Goto, K.** (2003). TERMINAL FLOWER2, an *Arabidopsis* homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of *FLOWERING LOCUS T* by *CONSTANS* in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell*. **15**, 2856-2865.
- Teper-Bamnolker, P. y Samach, A.** (2005). The flower integrator FT regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*. **17**, 2661-2675.

- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A. y Coupland, G.** (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*. **303**, 1003-1006.
- Wagner, D., Sablowski, R. y Meyerowitz, E. M.** (1999). Transcriptional activation of *APETALA1* by *LEAFY*. *Science*. **285**, 582-584.
- Wang, J.-W., Czech, B. y Weigel, D.** (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. **138**, 738-749.
- Weberling, F.** (1989). Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge University Press. Cambridge.
- Weberling, F.** (1992). Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge University Press
- Weigel, D. y Nilsson, O.** (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature*. **377**, 495-500.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F. y Meyerowitz, E. M.** (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*. **69**, 843-859.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F. y Meyerowitz, E. M.** (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*. **69**, 843-859.
- Weigel, D., and Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Weigel, D., and Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Weir, I., Lu, J., Cook, H., Causier, B., Schwarz-Sommer, Z, y Davies B.**(2004). CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development*. **131**, 915-922
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U. y Weigel, D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*. **309**, 1056-1059.

- William, D. A., Su, Y., Smith, M. R., Lu, M., Baldwin, D. A. y Wagner, D.** (2004). Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 1775-1780.
- Willige, B. C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E. M. N., Maier, A. y Schwechheimer, C.** (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell*. **19**, 1209-1220.
- Wilson, R. N., Heckman, J. W. y Somerville, C. R.** (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol*. **100**, 403-408.
- Winter, C.M., Austin, R.S., Blanvillain-Baufumé, S., Reback, M.A., Monniaux, M., Wu, M.F., Sang, Y., Yamaguchi, A., Yamaguchi, N., Parker, J.E., Parcy, F., Jensen, S.T., Li, H., and Wagner, D.** (2011). LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis Motifs, and a link to biotic stimulus response. *Developmental Cell* **20**: 430–443.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. y Provart, N.** (2007). An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*. **8**, e718.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J.-W., Weigel, D. y Poethig, R. S.** (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell*. **138**, 750-759.
- Yamaguchi, A., Wu, M.-F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R. S. y Wagner, D.** (2009). The microRNA-regulated SBP-box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL* and *APETALA1*. *Dev. Cell*. **17**, 268-278.
- Yanovsky, M. J. y Kay, S. A.** (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature*. **419**, 308-312.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X. and Schmid, M.** (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in Arabidopsis by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell*. **22**, 2156-2170.

- Yasui, Y., Mukougawa, K., Uemoto, M., Yokofuji, A., Surzuri, R., Nishitani, A y Kohchi, T.** (2012). The Phytochrome-Interacting VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 and VOZ2 Redundantly Regulate Flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell*. **8**, 3248-63.
- Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K. D., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M., Kolch, W.** (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*. **401**, 173-177.
- Yoo, S. J., Chung, K. S., Jung, S. H., Yoo, S. Y., Lee, J. S. y Ahn, J. S.** (2010). *BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)* has *TFL1*-like activity and functions redundantly with *TFL1* in inflorescence meristem development in Arabidopsis. *Plant J*. **63**, 241-253.
- Yu, H., Ito, T., Wellmer, F. y Meyerowitz, EM.** (2004). Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development. *Nat. Genet.* **36**, 157-161.
- Yu, H., Ito, T., Wellmer, F. y Meyerowitz, E. M.** (2004). Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development. *Nat. Genet.* **36**, 157-161.
- Yu, H., Xu, Y., Tan, E. L. y Kumar, P. P.** (2002). AGAMOUS-LIKE 24 a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 16336-16341.
- Yu, S., Galvão, V., Zhang, Y., Horrer, D., Zhang, T., Hong, Y., Feng, Y., Wang, S., Schmid, M. y Wang, J.** (2012). Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. *The Plant Cell*. **24**, 3320–3332.

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar pidiendo disculpas a aquellas personas que pudiera haber olvidado en estos agradecimientos.

En primer lugar quisiera agradecer a la parte científica empezando por el doctor D. Bradley por motivarme tanto y por hacerme ver que la ciencia es maravillosa y también por las ideas aportadas al inicio de este trabajo, gracias por todos tus emails desde UK. También quiero agradecer al Dr. Carlos Giménez por haber hecho que me enamorara de la genética en plantas enseñándome lo bonito de esta área, durante los primeros años de la carrera de biología. Gracias también al Dr. Antonio Costa de Oliveira por recibirme en su laboratorio en Brasil durante una estancia en el tercer año de tesis. Mi agradecimiento a los evaluadores externos de este trabajo por sus acertados comentarios empezando por el Dr. José Antonio Jarillo, la Dra. Soraya Peláez y el Dr. Rafael Lozano.

Agradecimientos también a las instituciones que han financiado este trabajo, empezando por la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho, fundación del gobierno Venezolano, la cual me otorgó una beca para realizar mi tesis de doctorado, a los proyectos del gobierno Español otorgados a mi director de tesis con los que se financió el trabajo.

Ya habiendo realizado los agradecimientos formales, quisiera empezar agradeciendo en primer lugar a Paco Madueño, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y por ser más que un jefe un amigo, por enseñarme lo importante que es la organización en la ciencia, y por disculparme tantas veces mis equivocaciones en el laboratorio, gracias por siempre tener una sonrisa y decirme no pasa nada lo repetimos, gracias por todos los consejos día a día, para hacer de mí un buen investigador, Paco siempre te voy a estar muy pero que muy agradecido. También quiero agradecer a Cristina Ferrándiz, por verle el lado positivo al trabajo, por darnos ánimos durante estos últimos años y por siempre aportar buenas y acertadas sugerencias al trabajo, muchas gracias Cris por todo tu apoyo y por la confianza.

Mil e infinitas gracias a los mejores compañeros de laboratorio del mundo, empezando por Anita, muchas gracias, has sido una gran amiga incondicional y un gran ejemplo a seguir siempre tan honesta y tan buena persona, responsable y sobre todo un ser humano maravilloso. También quisiera agradecer a la súper-mega técnico amiga, madre consejera Majo, gracias por toda tu ayuda, por todo tu apoyo de verdad que ninguna tesis en ese laboratorio es posible sin la gran Majo detrás, mil gracias Majo. A los chicos TFL1 Antonio y Pedro, qué grandes maestros fuisteis, gracias por todos los consejos y toda la ayuda, en especial a Antonio que en el último año fue parte fundamental en este trabajo. A mis chicas queridas, empezando por Marisa Navarrete, gracias por enseñarme tantas cosas, y por ayudarme tanto en los clonings, las agroinfiltraciones y en muchas cosas más, gracias por ser más que una compañera de laboratorio por ser una amiga muy especial TQM Rete Rete... muchas gracias a la andaluza más guapa, la súper Rocío, gracias amiga por tu ayuda y por siempre hacerme reír, y por todas las cañas y los flamenquines, eres lo máx.... también quisiera darle las gracias a mi maracucha de oro a Carla Méndez, mi compañera incondicional de laboratorio, gracias por siempre apoyarme, animarme y por

estar siempre en las buenas y en las malas, gracias también por deleitarnos durante dos años a los del labo con esas tartas tan ricas.

Ya saliendo de las fronteras del laboratorio a los primeros que quiero agradecer es a mi “valencià team”, a mis grandes amigos en el IBMCP y fuera de él, a las personas que les brindé y que me brindaron toda la confianza del mundo, empezando por mi amigo Vicent Llopis que aunque yo sé que a él no le gusta que le diga estas cosas eres un trozo de pan, eres una de las personas con mayor calidad humana que he conocido en mi vida, gracias por siempre estar allí, qué recuerdos tan bonitos me deja esta etapa de mi vida a vuestro lado. En segundo lugar y no menos importante a la segunda integrante del BAD ROMANCE, mi amiga Regi, qué puedo decir de esta mujer, que es como mi hermana aquí, gracias por ser tan buena persona y por demostrarme una amistad sincera y desinteresada... qué gratas cañas contigo y las que vendrán y qué buenas rajadas pegamos sobre todo al grupo de “fashion emergency”. También quisiera agradecer a la nueva integrante de BAD ROMANCE, Lorena que aunque te conozco por poco tiempo me he dado cuenta que eres una gran persona y una gran amiga, estoy seguro que te irá fenomenal.

A toda la gente del IBMCP en especial a la súper doctora y amiga Aurora, gracias por todos tus consejos y por ser tan solidaria y siempre dispuesta a ayudar, gracias por ser la más grande de ASTURIAS... Gracias a mi gran amigo Gerardo, eres un grande, gracias por todo tu apoyo y por todas esas buenas salidas, antes de que la tesis me convirtiera en un abuelo... Como olvidar a Ricardo, alias Che Guevara, al revolucionario del IBMCP, gracias por todos esos gratos momentos vividos y por ser un gran amigo, eres una gran persona... y como siempre y que no se le olvide a nadie el Che es de todos y para todas... También quisiera agradecer a mucha gente del IBMCP y grandes amigos como Sandra, por ser la más grande, a Alberto, Pilar, Juan Camilo, Marisol de Microscopia, Victoria del “inver” y por cuidarme las plantas cuando me iba a Venezuela por Navidad, a Rafa por siempre tenerme las plantas de tabaco listas. A todos mil gracias.

También quisiera dar gracias a toda mi gente de Venezuela en especial a mi familia que aunque desde lejos siempre han estado allí motivando y enviando buenas vibras, a mi madre, mi ejemplo a seguir esa gran mujer luchadora y trabajadora, a mi padre, por ser tan cariñoso y respetarme siempre en todas mis decisiones, a mis hermanos, no los quiero, los AMO, a mi abuela, tíos, primos... a mis amigos Yeni, Ricardo, Kel y Jetz gracias por existir, sois maravillosos...

Y por último y no menos importante a mi Paquito infinitas gracias, por todo, has sido parte fundamental en este trabajo, gracias por ayudarme en tantas cosas, desde venirte los fines de semana a tutorar plantas, embolsar, recoger semillas, gracias por esperar tantas veces fuera del instituto, gracias por los ánimos, por toda tu ayuda, eres lo mejor que me ha pasado en este país... y sobre todo gracias por ser ese gran ser humano que eres...

